



# **Erken Başlangıçlı Tay-Sachs Hastalığı Fare Modelinde Hücrel Patolojinin Araştırılması**

**Program Kodu: TUBITAK 1001**

**Proje No: 215Z083**

Proje Yürütücüsü:

**Prof. Dr. VOLKAN SEYRANTEPE**

Araştırmacı(lar): -

Bursiyer(ler):

Melike Can (Lisans)

Tugce Sengül (Lisans)

Hande Basırlı (Y.Lisans)

Nurselin Ateş (Doktora)

Orhan Kerim İnci (Y.Lisans/Doktora)

15 Temmuz 2019

İZMİR



## ÖNSÖZ

Tay-Sachs hastalığı bir lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal resesif olarak kalıtılan bu hastalıkta  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) adlı enzim eksikliği sonucu hücrelerde GM2 gangliosidi yıkılamayarak lizozomlarda birikmektedir. Bunun sonucunda özellikle sinir hücreleri hasar görmekte ve hastalar çok genç yaşta sinir hücrelerinin dejenerasyonu sonucu ölmektedirler. Tay-Sachs hastalığının patolojisini daha iyi anlamak ve yeni ilaç tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacı ile hastalığın fare modeli (*Hexa*<sup>-/-</sup>) uzun yıllar önce yaratılmıştır. Bu farelerde  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) kodlayan gen “knock-out” edilmiş olmasına rağmen normal bir fenotip ile karşılaşılmıştır. Tay-Sachs farelerinde normal fenotipin görülmesi sialidazların GM2 gangliosid'inin yer aldığı glikolipid yıkım yolağında rol aldığını düşündürmüştür. Laboratuvarımızda hem  $\beta$ -hekzosaminidaz A hem de Neu3 sialidaz eksikliği olan erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalığı fare modeli (*Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup>) yaratılmıştır (Seyrantepe ve ark. 2018). Projemiz kapsamında erken başlangıçlı (early onset) Tay-Sachs hastalığı fare modelinde hücresel patolojiye sebep olduğu mekanizmalar ilk defa araştırılmıştır. Elde etmiş olduğumuz bu fare modelinin farklı beyin bölgelerinde (korteks, beyincik, hipokampüs ve talamus) ve fibroblast hücrelerinde otofaji, apoptoz, reaktif oksijen türleri yanı sıra ikincil yağ metabolizması analiz edilmiştir. *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fare modelini kullanarak yapmış olduğumuz bu çalışmalar Tay-Sachs hastalığının patolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır. Elde ettiğimiz veriler ileride uygulamak istediğimiz deneysel ilaç tedavi yöntemlerinin etkilerini hem hücresel hem de fizyolojik açıdan monitor edebilmemiz için oldukça önemlidir.

## İÇİNDEKİLER

<u>Konu</u>	<u>Sayfa No</u>
Özet	xiii
Abstract	xiv
<b>Bölüm 1. Giriş</b>	<b>1</b>
<b>Bölüm 2. Literatür Özeti</b>	<b>3</b>
2.1. Yapılan Ön Çalışmalar ve Veri Birikimi	<b>3</b>
2.2. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Apoptoz	<b>4</b>
2.3. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Otofaji	<b>6</b>
2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Reaktif Oksijen Türleri	<b>8</b>
2.5. Lizozomal Depo Hastalıkları ve İkincil Yağ Metabolizması	<b>10</b>
<b>Bölüm 3. Gereç ve Yöntem</b>	<b>11</b>
3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması	<b>11</b>
3.1.1. Çiftleştirme ve Genotiplendirme	<b>11</b>
3.2. Öncül (Primer) Fibroblast Hücre Hattinin Kurulması ve Immortalizasyonu	<b>11</b>
3.3. Hücre Ölümü (Apoptoz) Analizleri	<b>12</b>
3.3.1. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi	<b>12</b>
3.3.2. In situ Apoptoz Analizi (Tunel)	<b>13</b>
3.3.3. MB Analizler (Gen ifade Analizleri)	<b>14</b>
3.3.4. Western Blot Analizleri	<b>15</b>
3.4. Otofaji Analizleri	<b>15</b>
3.4.1. MB Analizler (Gen ifade Analizleri)	<b>15</b>
3.4.2. Western Blot Analizleri	<b>16</b>
3.4.3. Otofagozom Analizi	<b>16</b>
3.4.4. IHC Analizleri	<b>17</b>
3.5. Reaktif Oksidatif Tür (Ros) Analizleri	<b>18</b>
3.5.1. Hücre İçi ROS Seviyesinin Belirlenmesi	<b>18</b>
3.5.2. Western Blot Analizi	<b>18</b>
3.5.3. Protein Karbonilasyon Analizi	<b>19</b>
3.5.4. Immunositofloresan Analizler	<b>19</b>
3.6. İkincil Yağ Metabolizması Analizleri	<b>20</b>
<b>Bölüm 4. Sonuçlar</b>	<b>21</b>
4.1. Çiftleştirme ve Genotiplendirme	<b>21</b>
4.2. Öncül Fibroblast Hücre Hattinin Kurulması ve Immortalizasyonu	<b>22</b>

4.3. Apoptoz Analizleri	22
4.3.1. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi	23
4.3.2. In situ Apoptoz Analizi (Tunel)	23
4.3.3. MB Analizler (Gen ifade analizleri)	25
4.3.4. Western Blot Analizleri	33
4.4. Otofaji Analizleri	43
4.4.1. MB Analizler (Gen İfade Analizleri)	43
4.4.2. Western Blot Analizleri	48
4.4.3. Otofagozom Analizi	55
4.4.4. IHC Analizleri	56
4.5. Reaktif Oksidatif Tür (Ros) Analizleri	61
4.5.1. Hücre İçi ROS Seviyesinin Belirlenmesi	61
4.5.2. Western Blot Analizi	63
4.5.3. Protein Karbonilasyon Analizi	64
4.5.4. Immunositofloresan Analizler	67
4.6. İkincil Yağ Metabolizması Analizleri	68
<b>Bölüm 5. Tartışma</b>	<b>72</b>
Kaynakça	79

## TABLO ve ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
<b>Tablo 1.</b> Genotipleme için kullanılan primerler	11
<b>Tablo 2.</b> Apoptoz gen ifade analizlerinde kullanılan primer dizileri ve PZR ürünlerinin uzunlukları	14
<b>Tablo 3.</b> Otofaji gen ifade analizlerinde kullanılan primer dizileri ve PZR ürünlerinin uzunlukları	16
<b>Şekil 1.</b> +/+, +/- ve -/- farelerin (A) Hexa ve (B) Neu3 genleri için PZR ile genotiplendirilme sonrası jel görüntüsü	21
<b>Şekil 2.</b> <i>WT</i> , <i>HexA</i> <sup>-/-</sup> , <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> ve <i>HexA</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> 4.5 aylık farelerden elde edilerek ölümsüzleştirilmiş fibroblastların görüntüsü	22
<b>Şekil 3.</b> (A) 4.5 aylık <i>WT</i> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> , <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> ve <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> fare korteks dokusundaki genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (B) 2.5 ve 4.5 aylık <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> ve <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> fare korteks dokusundaki genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü.	23
<b>Şekil 4.</b> 4.5 aylık <i>WT</i> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> , <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> ve <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> farelerin korteks, hipokampus, talamus (A) ve beyincik (B) bölgesinde hücre ölümü TUNEL yöntemi kullanılarak tanımlanmıştır. Çekirdek kırmızı olarak boyandı. hipokampus (C) ve beyincik bölgesinde (D) hücre ölümü yoğunluğu (n=3; *p<0.05, ***p<0.001, ****p<0.0001)	24
<b>Şekil 5.</b> 2.5 ve 4.5 aylık <i>WT</i> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> , <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampus dokularında ATF6 gen ifade oranı (n=3; *p<0.05, ****p<0.0001)	25
<b>Şekil 6.</b> 2.5 ve 4.5 aylık <i>WT</i> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> , <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> , <i>Hexa</i> <sup>-/-</sup> <i>Neu3</i> <sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampus dokularında Calnexin gen ifade oranı (n=3; ***p<0.001)	26

- Şekil 7.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında XBP1 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 27
- Şekil 8.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında SOD2 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01) 28
- Şekil 9.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında Catalase gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001) 29
- Şekil 10.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında Ttase1 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01) 30
- Şekil 11.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında BCL2 gen ifade oranı (n=3; \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001) 31
- Şekil 12.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında BCL XL gen ifade oranı (n=3; \*\*\*\*p<0.0001) 32
- Şekil 13.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında Bax gen ifade oranı (n=3) 33
- Şekil 14.** 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik ve korteks dokusunda Kaspaz 12 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı (n=3) 34
- Şekil 15.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda Kaspaz 9 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorusunun bant yoğunluk 34

oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

**Şekil 16.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Kaspaz 9 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 35

**Şekil 17.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Kaspaz 9 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 35

**Şekil 18.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Kaspaz 9 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 36

**Şekil 19.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde Korteks dokusunda Kaspaz 3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 36

**Şekil 20.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Kaspaz 3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 37

**Şekil 21.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Kaspaz 3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*\*p<0.01) 37

- Şekil 22.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Kaspaz 3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3,\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001) 38
- Şekil 23.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda Bip antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 39
- Şekil 24.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Bip antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 39
- Şekil 25.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Bip antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 40
- Şekil 26.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Bip antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 40
- Şekil 27.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda Fas antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 41
- Şekil 28.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Fas antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 41



- Şekil 29.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Fas antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 42
- Şekil 30.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Fas antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 42
- Şekil 31.** 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda TNFR1 antikoruna için Western Blot görüntüsü 43
- Şekil 32.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında LC3 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001) 44
- Şekil 33.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında Beclin1 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01) 45
- Şekil 34.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında p62 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01) 46
- Şekil 35.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında Lamp2 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001) 47
- Şekil 36.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda Beclin-1 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikor bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 48
- Şekil 37.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Beclin-1 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin 48

yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3,\*p<0.05)

**Şekil 38.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Beclin-1 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

**Şekil 39.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Beclin-1 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

**Şekil 40.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda p62 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

**Şekil 41.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda p62 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05,\*\*p<0.01)

**Şekil 42.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda p62 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0,05).

**Şekil 43.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda p62 antikoru için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0,05 \*\*p<0,01).

- Şekil 44.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks dokusunda LC3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 52
- Şekil 45.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda LC3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 52
- Şekil 46.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda LC3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 53
- Şekil 47.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda LC3 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3). 53
- Şekil 48.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin birincil fibroblast hücrelerinde LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunositokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi. 55
- Şekil 49.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi. 56
- Şekil 50.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon 57

yoğunluğunun gösterimi.

**Şekil 51.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi. 58

**Şekil 52.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus CA1 ve CA2 bölgelerinde LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi. 59

**Şekil 53.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus CA3 bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi. 60

**Şekil 54.** (A) Ölümsüz Fibroblastların hücre içi ROS seviyesinin belirlenmesi için H2DCFDA ile FACS analizi. (B) Negatif kontrol ve deney grubu hücrelerindeki yeşil flurosans ışımaya yüzdesi(n=3, \*\*\*\*p<0.0001) 61-62

**Şekil 55.** (A) Birincil Fibroblastların hücre içi ROS seviyesinin belirlenmesi için H2DCFDA ile FACS analizi. (B) Negatif kontrol, pozitif kontrol ve deney grubu hücrelerindeki yeşil floresan ışımaya yüzdesi (n=3, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001) 62-63

**Şekil 56.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblastlarında APE1 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) APE1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3) 63

**Şekil 57.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblastlarında IKK $\alpha$  antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme 64

kontrolü olarak kullanıldı. (B) IKB $\alpha$  antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

**Şekil 58.** *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinden oluşturulmuş ölümsüz fibroblast hatlarından (A) iki farklı (RIPA ve TNN) liziz solüsyonu ile liziz edilmiş ve 10  $\mu$ g şeklinde yüklenmiş proteinlerin karbonil miktar analizi. (B) farklı zaman dilimlerinde (15 dakika, 30 dakika, 60 dakika) liziz edilmiş ve farklı miktarlarda (10  $\mu$ g ve 20  $\mu$ g) yüklenmiş proteinlerin karbonil miktar analizi. 64

**Şekil 59.** (A) 2.5 aylık ve (B) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin korteks dokusunda protein karbonilasyonu görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (C) Karbonilli proteinlerin bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3; \*p<0,05). 65

**Şekil 60.** (A) 2.5 aylık ve (B) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin beyincik dokusunda protein karbonilasyonu görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (C) Karbonilli proteinlerin bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi. (n=3; \*p<0,05). 66

**Şekil 61.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-1 proteininin immunositokimya ile analizi. (yeşil ışımalar APE1 proteinini maviler ise DAPI ile boyanmış nükleusları göstermektedir. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.) (B) Yeşil ışımaların ImageJ programı ile yoğunluk ölçümünün hücre sayısına göre normalizasyonu. (\*p<0,05) 67

**Şekil 62.** (A,B,C) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin korteks bölgesinde bulunan ikincil yağlar için lipidom kütle spektrometre analizi (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001). 68-69

**Şekil 63.** (A,B,C) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin hipokampus bölgesinde bulunan ikincil yağlar için lipidom kütle spektrometre analizi (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001). 69-70

## ÖZET

Sialidaz enzimleri glikolipid ve glikoproteinlerin yapısında bulunan sialik asitleri uzatlaştırarak çeşitli hücreyel olayları kontrol eden glikohidrolik enzimlerdir. Memeli hücrelerinde 4 farklı sialidaz enzimi bulunmaktadır. Bunlar lizozomal (Neu1), sitosolik (Neu2), hücre zar sialidazı (Neu3) ve lizozomal sialidaz (Neu4) olarak isimlendirilirler. Neu4 ilk kez klonlanarak biyokimyasal özellikleri tanımlanmış ve in vitro şartlarda bu enzimin asitik pH'da GM2 gibi glikolipid grubundaki gangliosidlere karşı aktivitesi olduğunu gösterilmiştir (Seyrantepe ve ark., 2004). Bir başka çalışmada ise GM2 gangliosidosis olarakta bilinen Tay-Sachs hastalarına ait nöroglia hücrelerine Neu4 kodlayan plasmidin aktarılması sonucu lizozomlarda biriken GM2 gangliosid'inin Neu4 tarafından yıkıldığı ve hücrelerde görülen patolojinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Seyrantepe ve ark., 2008). In vitro şartlarda sialidaz enzimlerinin GM2 gangliosid'ini yıktığı bilinmekle birlikte, fenotip bulgusu bulunmayan Tay-Sachs hastalığı fare modelinde (*Hexa*<sup>-/-</sup>) gangliosid yıkım yolağında in vivo olarak sialidazların nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Bu hipotezi test etmek amacı ile yaratılan *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerde ise beklenmedik şekilde erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalığı fenotip bulguları vardır. Bu farelerde 3-4 aylıkken ataksi ve tremor gibi nörolojik bulgular gözlenmektedir ve Tay-Sachs hastalığının şimdiye kadar yaratılmış ilk ve tek modeli olma özelliğini taşımaktadır. 4.5 aylıkken aniden ölen bu yeni fare modelinde beyin ve organlarda anormal GM2 gangliosid ve diğer gangliosidlerin biriktiği tesbit edilmiştir ve bu birikimin hücreyel patoloji üzerine etkisi araştırma projesinin konusunu oluşturmaktadır. Projemizde farelerde elde edilen farklı beyin bölgelerinde (serebral korteks, beyincik, hipokampus ve hipotalamus) ve fibroblast hücrelerinde apoptoz, otofaji, reaktif oksijen türleri yanı sıra ikincil lipid metabolizması araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar ölümcül bir çocukluk çağı hastalığı olan ve ülkemizde sıklıkla rastlanan Tay-Sachs hastalığının hücreyel patolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen Neu3 sialidazı hedeflendiği yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine öncelik edecektir.

**Anahtar Kelimeler:** Neu3, beta-HexA, Lizozom, Tay-Sachs,



## ABSTRACT

Sialidases are glycohydrolytic enzymes that influence cellular events by removing sialic acids from glycolipids and glycoproteins. Four sialidases have been identified in mammalian cells. These are lysosomal (Neu1), cytosolic (Neu2), plasma membrane associated (Neu3) and lysosomal (Neu4). Previously, we have cloned and determined the biochemical properties of Neu4 sialidase and demonstrated that Neu4 sialidase has considerable activity towards gangliosides such as GM2 at acidic pH (Seyrantepe et al, 2004). In vitro we also showed that glycolipid catabolism was successfully restored in Neu4-transfected lysosomal  $\beta$ -hexosaminidase A deficient Tay-Sachs neuroglia cells indicating the correction of the organellar pathology as a result of reduction of accumulated GM2 ganglioside (Seyrantepe et al, 2008). Although sialidases have activity towards GM2 ganglioside in vitro, the biological role of these sialidases in ganglioside degradation in the mouse model of Tay-sachs disease without any phenotype (*Hexa*<sup>-/-</sup>) remain unknown. In order to clarify this hypothesis, we generated *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> mice with unexpected early onset Tay-Sachs disease phenotype. Neurological findings such as tremor and ataxia were observed in those mice at age 3-4 months. Mouse model is the first and only model with Tay-Sachs disease phenotype. New mouse model died suddenly at age 4.5 months due to the abnormal accumulation of GM2 and other gangliosides in brain and visceral organs. The affect of ganglioside accumulation on cellular pathogenesis was the subject of this research proposal. In our project we studied apoptosis, autophagy, reactive oxigen species and secondary lipid metabolism in different section of brain (cerebral cortex, cerebellum, hippocampus and hypothalamus) and fibroblast cell line. Outcome of this study may help to understand better the cellular pathology of lethal childhood Tay-Sachs disease which is common in Turkey and the role of Neu3 sialidase in the regulation of lipid metabolism which will be targeted by new drugs and therapies.

**Keywords:** Neu3, beta-HexA, Lysosome, Tay-Sachs





# BÖLÜM 1

## GİRİŞ

Tay-Sachs hastalığı otozomal çekinik olarak kalıtılan bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) enzim eksikliği sonucu özellikle sinir hücre lizozomlarında GM2 gangliosid adlı glikosifingolipid birikmektedir. Bunun sonucunda özellikle beyin dokusu ve sinir sistemi ciddi hasar görmektedir. Tay-Sachs hastaları doğumdan sonraki ilk bir kaç ay normal gelişim göstermekle birlikte hastalık çok hızlı ilerlemekte ve kısa sürede sağırılık, körlük, yutma zorluğu, kas deformasyonu, paraliz ve epilepsi gibi klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Tedavisi bulunmayan bu hastalıkta çocuklar 3-4 yaşlarında ölmektedir. Tay-Sachs hastalığı fare modeli uzun yıllar önce yaratılmış fakat farelerde  $\beta$ -hekzosaminidaz A kodlayan gen "knockout" edilmiş olmasına rağmen normal bir fenotip ile karşılaşmıştır. Öyleki Tay-Sachs hastalarının tam tersine  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliği olan fareler normal yaşamlarını sürdürmekte ve herhangi bir nörolojik bulgu göstermemektedir. Tay-Sachs hastalığı fare modelinde (*Hexa*<sup>-/-</sup>) normal fenotipin görülmesi sialidaz enzimlerinin GM2 gibi glikolipidlerin yıkım reaksiyonlarında rol aldığını ve sadece farede olduğu düşünülen bir by-pass mekanizması ile GM2 gangliosidinin bir ya da birden fazla sialidaz enzimi tarafından önce GA2 adlı bir glikolipid'e yıkıldığı ve daha sonra  $\beta$ -Hekzoaminidaz B tarafından laktozilseramid'e dönüştürüldüğü düşünülmektedir. Sialidaz enzimlerinin glikolipidlerin yıkımındaki rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için yaptığımız in vitro çalışmada  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliği olan insan Tay-Sachs nöroglia hücrelerine Neu4 sialidaz enzimi ifade eden plazmidi aktarılmış ve biriken GM2 gangliosidinin yıkılarak lizozom patolojisinin normale döndüğü gösterilmiştir (Seyrantepe ve ark., 2008). Neu4 sialidazın fizyolojik rolünün daha iyi anlaşılabilmesi için ise hem Neu4 hem de  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliği olan fare modeli (*Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu4*<sup>-/-</sup>) yaratılmıştır. Farelerin sadece bir kısmında Tay-Sachs hastalarına benzeyen epileptik krizler gözlenmiştir. Bu epileptik krizler tek Neu4 eksikliği veya tek  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliği olan farelerde ise gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra yapılan elektron mikroskopi ve immunohistokimyasal analizler sonucu bu farelerde normal farelere göre özellikle beyinde hipotalamus ve korteks'te çok fazla sinir hücresinin öldüğü bunun da her iki enzim eksikliği sonucu iki kata yakın artan GM2 gangliosid miktarından dolayı olduğu düşünülmüştür (Seyrantepe ve ark., 2010). Neu4 sialidaz tek başına GM2 gangliosidinin yıkımı için yeterli olmadığı ve diğer sialidazlarında bu yıkımda rol aldığını düşündürmüştür. Bu hipotezimizi test etmek amacı ile yaratılan *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Neu3*<sup>-/-</sup> fareler çiftleştirilmiştir. Elde





edilen çift enzim eksikliği olan farelerde (*Hexa-/-Neu3-/-*) 3-4 aylıkken anormal GM2 gangliosid birikimine bağlı olarak tremor (titreme) ve ataxia (kas koordinasyon bozukluğu) gibi nörolojik bulgular göstermiş ve bu fareler 4.5 aylıkken aniden ölmeye başlamıştır. Yarattığımız fareler  $\beta$ -Hexosamidaz A ve Neu3 sialidaz enzim eksikliği bulunan şimdiye kadar yaratılmış ilk ve tek erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalığı fare modelidir ve nörolojik bulgular vardır. Bu farelerden elde edilen hücre ve dokularda otofaji, apoptoz, reaktif oksijen türleri yanı sıra ikincil yağ metabolizması araştırılmıştır. Uzun vadeli hedefimiz tedavisi bulunmayan ölümcül bir çocukluk çağı hastalığı olan Tay-Sachs hastalığının patolojisini fenotipik olarak hastalığa çok yakın bulguları olan fare modelini kullanarak daha iyi anlamaktır.

## BÖLÜM 2

### LİTERATÜR ÖZETİ

Tay-Sachs hastalığı lizozomal depo hastalığıdır. Otozomal resesif olarak kalıtılan bu hastalıkta  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) adlı enzim eksikliği sonucu hücrelerde GM2 gangliosidi yıkılamayarak lizozomlarda birikmektedir. Bunun sonucunda özellikle sinir hücreleri hasar görmekte ve hastalar çok genç yaşta sinir hücrelerinin dejenerasyonu sonucu yaşamlarını yitirmektedir. Tay-Sachs hastalığında patolojisini daha iyi anlamak ve ilaç tedavi yöntemlerinin geliştirilebilmesi amacı ile hastalığın ilk fare modeli iki farklı grup tarafından uzun yıllar önce yaratılmıştır (Sango ve ark., 1995, Phaneuf ve ark.1996). Bu farelerde  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) kodlayan gen “knock-out” edilmiş olmasına rağmen normal bir fenotip ile karşılaşmıştır. *Hexa*<sup>-/-</sup> fareler Tay-Sachs hastalarının tam tersine yaşamlarını normal olarak sürdürmekte ve ilk bir yıl içerisinde herhangi bir nörolojik bulgu göstermemektedir (12 aylık fare ömrü insanda 40 yaşa karşılık gelmektedir fakat Tay-Sachs hastaları çocukluk çağında (3-4 yaş) ölmektedir). Tay-Sachs farelerinde normal fenotipin görülmesi sialidazların GM2 gangliosid’inin yer aldığı glikolipid yıkım yolağında rol aldığını düşündürmüştür. Bu hipoteze göre  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliğinden dolayı birikmesi gereken ve sialik asid içeren GM2 gangliosidi bir ya da birden fazla sialidaz enzimi (Ör. Neu3) tarafından metabolik ‘bypass’ reaksiyonu ile önce GA2 adlı bir glikolipide yıkılmakta (sialik asitin hidrasyonu) ve daha sonra bir başka lizozomal enzim olan  $\beta$ -hekzosaminidaz B (HexB) tarafından laktozilseramid’e dönüştürülmektedir. GM2 gangliosid  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliğine bağlı olarak az miktarda birikmekte buna karşın büyük bir kısmının sialidazlar ile yıkılması sonucu *Hexa*<sup>-/-</sup> farelerde normal bir fenotipi ortaya çıkmaktadır.

#### 2.1. Proje Öncesi Yapılan Ön Çalışmalar ve Veri Birikimi

Proje yürütücüsü Prof. Dr. Volkan Seyrantepe’nin  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) eksikliği olan *Hexa*<sup>-/-</sup> farelerde metabolik ‘by-pass’ yolağında sialidaz Neu1 ve Neu3’ün rol alıp almadığını tesbit etmek amacı sunduğu proje önerileri EMBO ve FB7 programları ile desteklenmiştir. *Neu3*<sup>-/-</sup> fareler daha önce Dr. Miyagi tarafından yaratılmıştır ve yapılan işbirliği anlaşması çerçevesinde (MTA) başlanmıştır. Neu3 sialidaz eksikliğine bağlı herhangi bir fenotip göstermeyen bu farelerde beyin ganglioside içeriği etkilenmemiştir (Yamaguchi ve ark, 2012). Laboratuvarımızda yaratılan Tay-Sachs hastalığı fare modellerinden biri olan ve ‘erken başlangıçlı (early onset) Tay-Sachs hastalığı fare modeli olarak tanımlanan farelerde

(*Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup>*) hem  $\beta$ -hekzosaminidaz A hem de Neu3 sialidaz eksikliği vardır. Bu farelerde normal doğum ve gelişim olmasına rağmen yaklaşık 3.5-4 aylıkken tremor ve ataksi gibi nöropatolojik bulgular gözlenmiştir. Fareler yaklaşık 4.5 aylıkken aniden ölmektedir. Laboratuvarımızda yapılan çalışmalarda  $\beta$ -hekzosaminidaz A ve Neu3 sialidaz enzim eksikliği olan fare dokularında özellikle beyin, karaciğer ve akciğer dokularında ince tabaka kromatografi yöntemi ile anormal miktarda GM2 gangliosid birikimi tesbit ettik (Seyrantepe ve ark., 2018). anti-GM2 antikoları ile yaptığımız immünohistokimyasal analizlerde yine  $\beta$ -hekzosaminidaz A ve Neu3 sialidaz enzim eksikliği olan farelerde korteks ve hipotalamusta olagan üstü GM2 birikimi gözlemledik. Almanya Heidelbergde bulunan Kanser Araştırma Merkezindeki araştırmacılardan Prof. R Sandhoff ile ortak gerçekleştirdiğimiz kütle spektrometri analizlerinde ise GM2 gangliosidi yanı sıra Lac Cer, GM3 ve GA2 gibi diğer gangliosidlerinde beyin dokusunda anormal birikimini tesbit ettik. Ayrıca AÜ Tıp Fakültesi Histoloji Embriyoloji ABD öğretim üyesi Prof Dr Esra Erdemli ve Hacettepe Tıp Fakültesi Nörolojik Bilimler ve Psikiatri Enstitüsü öğretim üyesi Prof Dr Turgay Dalkara ile yapılan iş birliği sonucu *Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup>* farelerde beyin dokusundaki GM2 birikiminin yol açtığı lizozomal histopatolojiyi (lipid whorls) elektron mikroskopu ile gösterdik. *Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup>* farelerde ayrıca kemik ve omurga bozukluğu X-ray ile görüntüleme sonucu tesbit edilmiştir (Seyrantepe ve ark., 2018).

## 2.2. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Apoptoz

Lizozomal depo hastalıklarında yıkılamayan substratların lizozomlar içerisinde birikmesi zamanla hücrelerin şişmesine, hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne neden olur (Tardy et al. 2004). Birçok lizozomal depo hastalığında nöral dejenerasyon görülür ve bunun sebebi apoptotik hücre ölümüdür. Endoplasmik retikulum ve oksidatif stresin lizozomal depo hastalıklarında hücrelerdeki apoptozu kolaylaştırdığı bilinmektedir. Tay-Sachs ve diğer lizozomal depo hastalıklarından alınan hasta fibroblast hücreleri incelendiğinde ER stres marker genlerinin (ATF6, calnexin, Grp78 and XBP1) ve oksidatif stres marker genlerinin (superoxide dismutase-2 (SOD2), catalase and thioltransferase-1 (TTase1)) ifadesinin arttığı gözlemlenmiştir. Bu genlerinin ekspresyon seviyelerinin artması hücrelerde gerçekleşen apoptozun göstergesidir. Ayrıca ER stresin yanında katlanmamış protein cevabında (UPR) lizozomal depo hastalıklarında apoptozu yol açtığı bilinmektedir. Hatta UPR'ın apoptozisin öncüsü olduğu düşünülmektedir (Wei et al. 2008). Tay-Sachs ve Sandhoff hastalarından alınan otopsi örnekleri 'in situ DNA end' işaretleme tekniği kullanılarak incelendiğinde hasta örneklerinde serebral korteks, beyin kökü, beyincik and spinal kord'ta apoptozis gözlemlenmiş ve gangliosidlerin ve ilişkili diğer glikolipidlerin birikmesinin programlı hücre

ölümünü tetiklediği düşünülmüştür. Benzer şekilde HexB geni knockout edilen fare modelleri 'DNA laddering' tekniği kullanılarak araştırılmış ve özellikle *Hexb*<sup>-/-</sup> faresinin serebral korteks, beyin kökü, beyincik and spinal kord'unda apoptozis sonucu oluşan DNA fragmentasyonu gözlemlenmiştir. Hasta örneklerinde apoptoz görünmesine karşın *Hexa*<sup>-/-</sup> farelerde de aynı bölgeler incelendiğinde metabolik bypass nedeni ile DNA fragmentasyonu gözlenmemiştir (Huang et al. 1997).

Gangliositler özellikle sinir hücre zarının yapısında ve organizasyonunda önemli bir yere vardır. Genellikle hücrenin dış zarında yer almasına rağmen 10% luk bir bölümü mitokondri ve endoplazmik retikulumda da bulunmaktadır. Gangliositler hücresel tanıma, bağlanma, reseptör sinyal iletimi, büyüme regulasyonu ve farklılaşmada rolü olan anahtar sinyal molekülleridir. Ayrıca, gangliosit miktarının artmasına bağlı olarak hücresel stress koşulları oluşur ve apoptotik program tetiklenir (D'Azzo, Tessitore, and Sano 2006). Bilindiği gibi birçok sinyal iletimi olayları hücre zarında meydana gelir. Hücre zarında yer alan kaveola ve lipid raftların yapısı gangliosit çeşitleri ve miktarına bağlı olarak değişir. Bu değişiklik endoplazmik retikulum (ER) ve mitokondri gibi organellerin yapısını ve fonksiyonunu etkiler. Hücrelerin kaderini bölüneceğine yada apoptoza gideceğine karar verilir (D'Azzo, Tessitore, and Sano 2006). ER zarında bulunan gangliositler ise ER zarının yapısını ve dinamikliğinin düzenlenmesine yardımcı olur. Bu nedenle gangliosid miktarındaki değişiklik hücre zarında bulunan diğer bileşenlerinde yapısını, miktarını ve davranışını da değiştirir. ER Ca<sup>+2</sup> iyonlarının depolandığı organeldir ve bu depolama en fazla nöron hücrelerindedir. Birçok protein katlanması sırasında Ca<sup>+2</sup> iyonlarına ihtiyaç duyar. ER da bulunan Ca<sup>+2</sup> iyonlarının azalması yanlış katlanmış protein miktarının artmasına sebep olarak hücreye zarar verir ve apoptoza gitmesine neden olur. Bunu önlemek için hücrede ER stres cevabı ve katlanmamış protein cevabı (UPR) adı verilen kontrol sistemi gelişmiştir. Bu kontrol isteminde görev yapan proteinlerden birisi BIP'tir (D'Azzo, Tessitore, and Sano 2006). Normal hücresel koşullarda BiP, ER da bulunan UPR sensör proteinlerine bağlı bulunur. Bu proteinler Ser/Thr kinaz ve ribonukleaz IRE1, Leuzipper transkripsiyon faktörü ATF6 ve Ser/Thr kinaz PERK. ER'de katlanmamış ya da yanlış katlanmış protein miktarı arttığı zaman BIP UPR sensör proteinlerinden ayrılır. PERK ve IRE1 homodimer oluşturur ve aktif hale gelir. ATF6 is aktif hale gelerek çekirdeğe gider burada BIP, calreticulin gibi ER stres cevap proteinlerin sentezine yardımcı olur. Ayrıca CHOP/GADD153 gibi proapoptotik proteinlerin sentezine tetikler ve Bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu azaltır. Hücre böylece apoptoza gider (D'Azzo ve ark., 2006). Yine normal koşullar altında prokaspaz-12 ER'ın sitoplazmik tarafında yer almaktadır. Sitozolik Ca<sup>+2</sup> miktarının artması proapoptotik Bax and Bak proteinlerinin aktif hale gelerek prokaspaz-12 proteininin aktif kaspaz-12 proteinine

dönüşmesini tetikler. Bu dönüşüm kapsaz yolağını (kaspaz-9 ve kaspaz-3) ve Bim/Bax yolağını tetikler. Bim/Bax yolağı sitokrom-c, apoptosis indükleyici faktör (AIF) ve SMAC/Diablo salınımını aktif hale getirir. Sitokrom-c salınımı apoptozom bileşiminin oluşumunu tetikler. Apoptozom komponentleri; sitokrom c, Apaf-1 ve prokaspaz 9'dur. Sitokrom-c'nin Apaf-1'e bağlanması prokaspaz-9'un aktivasyonuna sebep olur. Aktif hale gelen kaspaz-9 apoptozisi gerçekleştiren kaspazları aktive eder. Endonükleaz G ve AIF apoptozis sırasında mitokondriden çekirdeğe yerleşir ve kaspazlardan bağımsız DNA fragmentasyonuna neden olur. Smac/Diablo ise kaspazlara bağlanarak ve apoptozis protein inhibitörlerini inhibe ederek apoptozun gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca ER stres tarafından tetiklenen hücre ölüm sinyalleri kaspaz-12 yolağını kullanmadan doğrudan kaspaz-8 yolağını kullanarak apoptozu sebep olabilmektedir (D'Azzo ve ark., 2006).

GM2 gangliosidosis (Tay-Sachs, Sandoff ve geç dönem Tay Sachs [Late-onset Tay-Sachs]) fare modellerinde TNF-R1 ve Fas proteinleri merkezi sinir sisteminde incelendiğinde sitokin miktarlarında normal farelere göre arttığı gözlemlenmiştir. Bu artış inflamasyon indükleyen programlı hücre ölümden kaynaklanmaktadır. Hücrelerde TNF-R1 ve Fas sitokinlerinin yüksek oranda sentezlenmesi merkezi sinir sistemi hücrelerini apoptozu götürmektedir (Jeyakumar ve ark., 2003).

### 2.3. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Otofaji

Lizozomlar hücre ölüm ürünlerinin sindirilmesinde görev alan, makromoleküllerin yıkımları için gerekli enzimleri içeren asidik bir organeldir. Yıkım enzimlerinin herhangi birinin eksikliği durumunda hücrelerin lizozomlarında çok miktarda yıkılmamış makromolekül birikir. Eksikliği olan enzimin substratının birikmesi ikincil etkilere sebep olur ve **endozom-otofaji-lizozom** sisteminin yanısıra hücredeki mitokondri, ER, Golgi gibi organelleri, kısaca tüm hücre fonksiyonları etkileyen bir kaskat başlatır (Ravikumar ve ark. 2010; Platt ve ark.,2012). Otofaji (kendi kendini yeme) proteinlerin, organellerin ve sitoplazmik parçacıkların apoptozda olduğu gibi kaspazlar ile değil de lizozom ile birleşerek oluşturulan otofagozom organeli içinde, lizozomda bulunan yıkım enzimleri ile sindirilmesi/yıkılması ve geri dönüştürülmesi olayıdır. Lizozomlar otofaji için kritik öneme sahiptir dolayısıyla lizozomal depo hastalıklarında yıkılamayan ürünlerin lizozomlarda birikmesi bu hastalarda otofaji yolağının bozulmuş olabileceği ve bu bozulmanın da hastalığındaki patolojide rolü olabileceğini düşündürmüştür. Yapılan çalışmalar birçok farklı lizozomal depo hastalığında otofaji yolağının bozulmuş/etkilenmiş olduğunu göstermektedir (Kiselyov ve ark. 2007; Ballabio ve ark. 2009; Vinter ve ark 2010; Platt ve ark.,2012).

Ör. Danon hastalığı kalp (kardiomyopati) ve vücuttaki diğer kasların zayıflaması (miyopati) olarak tanımlanan harekette zorluk görülen bir lizozomal depo hastalığıdır. Lizozomla ilişkili membran proteini-2 (LAMP-2) de görülen mutasyonlar ile bu proteinin az ya da hiç olmaması durumunda ortaya çıkar. LAMP-2'nin eksikliği durumunda otofajik vakuollerin lizozom ile birleşmesi gerçekleşmediği için otofagozomların hücre içinde birikmesine neden olur. Hastaların kas hücrelerinde normalden daha büyük ve çok sayıda olmasının kas hücrelerinin ölümüne ve kas zayıflığına rol açtığını düşünülmektedir. Bu durum LAMP-2'nin otofajide rolü olduğunu ortaya koymaktadır (Tanaka ve ark. 2000). NCL hastalığı proteolipidlerin (mitokondri ATP sentaz Subunit C ve sipingolipidaktivator protein gibi) nöron hücresi lizozomlarında birikmesi ile oluşan bir başa lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta beyin dokusunda bir otofajimarkerı olan LC3-II proteinin yok yüksek olduğu gösterilmiştir (Vinter ve ark., 2010). Sifingomyelinin yıkılamadığı bir hastalık olan NPC'de hastaların fibroblast hücrelerinde otofaji sırasında aktive olan Beclin-1 proteininin yüksek miktarda ifade edildiği gösterilmiştir. Ayrıca *NPC<sup>-/-</sup>* farelerde otofaji özellikle beyin dokusunda gözlenmiş ve otofaji markerlarından mikrotübül-ilişkili protein 1 hafif zincirinin (LC3), LC3-1 olarak geçen sitozolik halinden değiştirilmiş hali olan LC3-II'ye çok daha hızlı dönüştüğü ve otofagozom membranı ile etkileşerek otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir. LC3-II proteini hücrede sadece otofagozom membranı ile etkileşen diğer membranlarla etkileşmeyen özel bir proteindir. Bu hastalıkta otofajinin aktivasyonunun Beclin-1 proteininin aktive edilmesi ile gerçekleştiği de gösterilmiştir (Pacheco ve ark. 2007). Pompe hastalığı ise lizozomal asit-alfa-glukozidaz enzim eksikliği olan ve lizozomlarda glikojenin biriktiği, buna bağlı olarak da iskelet ve kalp kaslarının ciddi bir şekilde etkilendiği bir depo hastalığıdır. Glikojen birikimin sadece lizozomlarda değil aynı zamanda otofagozomlarda biriktiği ve hücrede çok sayıda vakuoler yapının oluşmasına neden olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda bu vakuollerde LAMP-1 proteinin LC3-II ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (Fukuda ve ark. 2006; Raben ve ark. 2007). MSD hastalığı fare modelinde fare beyinlerinde cerebral korteks, talamus ve cerebellum kısımlarında yapılan çalışmalarda otofagozommarkerı LC3 incelenmiş, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmüş halinin miktarındaki artışın otofagozom sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Settembre ve ark. 2008). Benzer şekilde otofajik akıştaki bozulma nedeni ile ubiquitin eklenmiş proteinlere spesifik p62 proteininde de artış görülmüştür (Settembre ve ark. 2008; Raben ve ark. 2009). Fabry hastalığı alfa-galaktozidaz A enzim eksikliği sonucu anormal glikosipingolipid katabolizması olan lizozomal depo hastalığıdır. Böbrek hücrelerinde LC3 proteini üzerine yapılan çalışmalarda otofajik vakuollerin bu hastalıkta da çok sayıda birikmiş olduğunu göstermiştir (Chevrier ve ark. 2009). Glukozilseramidaz enzim eksikliğine bağlı olarak glukozilseramid birikimi olan Gaucher hastalığında da otofajinin bozulduğu ve LC3-II'nin miktarının arttığı gösterilmiştir (Tatti ve ark. 2011). B-galaktozidaz enzim eksikliği

sonucu GM1 gangliosit birikimi olan GM1 gangliosidosis faresinde LC3-II'nin ve Beclin1'in artışı ile otofajinin anormal aktivasyonu gösterilmiş ve hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmiştir (Takamura ve ark. 2008; Osellame ve ark. 2014). Otofajik akışın bozulmuş olması GM2 ve GA2 birikimi olan Sandhoff hastalığında da gösterilmiştir (Vinter ve ark 2010; Platt ve ark. 2012). Sonuç olarak lizozomlarda gerçekleşen 'substrat' birikimden dolayı otofaji yolağının, etkilenme mekanizması hastalığa bağlı olarak değişmekte (otofajinin artması ya da engellenmesi veya vakuollerin birikmesi) ve tüm lizozomal depo hastalıklarında bu yolak etkilenmektedir. Otofaji yolağında meydana gelen bu değişim ve bozulmalar nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmektedir (Settembre ve ark. 2008). Otofajinin artması ya da azalması hücre içinde diğer yolakları da etkilemektedir öyleki  $Ca^{2+}$  metabolizması değişmekte, mitokondri yapı ve fonksiyonlarında farklılıklar ortaya çıkmakta, kaspazların aktivasyonu ile apoptoza yönelim artabilmektedir (Kiselyov ve ark. 2007). Çalışmamızda *Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup>* farelerinde lizozomlarda GM2 gangliosit miktarındaki artışa bağlı olarak otofaji mekanizmasının nasıl etkilendiği, sinir ölümünden sorumlu mekanizma olup olmadığı araştırılmıştır.

#### 2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları ve Reaktif Oksijen Türleri

Birçok çalışma reaktif oksijen türlerinin (ROS) lizozomal depo hastalıklarında görülen hücre ölümlerinin en önemli etkeni ya da genel araçları olduğunu göstermiştir (Wei ve ark.,2008). GM1 ve GM2 gangliosidosis, uyarılabilir nitrik oksit sentez enzimi ve nitrotyrozinin microglia ve makrofaj hücrelerinde (Jeyakumar ve ark., 2003) ve ROS' un Fabry hastalık modellerindeki artışı görülmektedir (Shen ve ark., 2008). Apurinic endonülez 1 enziminin (APE1) (oksidatif DNA hasarlarını onaran protein) Gaucher bağ doku hücrelerinde artışı gözlenmiştir (Zou, 2007), fakat bu artış Gaucher hastalarının kemik iliği stroma hücrelerinde görülmemiştir (Campeau ve ark., 2009). Niemann-Pick C 1 (NPC1) hastalarının bağ doku microarray analiz sonuçlarında oksidatif stresin artırılmasının, ROS' un ve yağ peroksitasyonunun artışının akut oksidatif travmadan sonraki dönemde bağ dokularını hücre ölümlerine daha yatkın hale getirdiğini göstermiştir. Oksidatif stresin hücre yolaklarındaki temel rolü birincil substratların birikmesine doğrudan etki etmektense, lizozomal depo hastalıklarında diğer hücresel yolaklar ve stresler ile birlikte ikincil biyokimyasal hücre yolakları olarak görev almaktadır. ROS'un ayrıca lizozomal depo hastalıklarının patolojisinin açıklanmasında çok önemli bir rolü olabileceği tahmin edilmektedir, özellikle oksidatif stresin diğer bilinen sinir dokusunun bozulması durumlarında merkezi rol oynadığı bilinirken (Vinter ve ark.2010). Fabry hastalık modellerinde alpha-galactosidase A eksikliğinin lizozomlarda globotriaosylseramit (Gb(3)) birikimini ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Fabry hastalığında,



Gb(3)'ün damar endotelinde birikimi ROS'un artan üretimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fabry hastalarının endotel hücrelerindeki plasma örneklerinde ROS artışının kontrol grublarına göre önemli miktarda olduğu gözlemlenmiştir (Shen ve ark. 2008). Ayrıca Fabry hastalarının eritrositlerinde düşük seviyede gözlemlenmesi; glutathione (GSH), glutathione peroksidaz (GPx) ve superoksit dismutaz/catalaz (SOD/CAT) oranındaki artış ile ilişkilendirilmiştir (Biancini ve ark.2012) Reaktif oksijen türleri, indirgenmesi tamamlanmamış oksijen sonucunda oluşan reaktivitesi yüksek moleküller nedeni ile, ayrıca otofaji de önemli derecede rol oynamaktadırlar. Fizyolojik koşullar altında mitokondride kullanılan oksijenin %1-3' lük kısmı elektron taşıma zinciri ile ROS' a dönüştürülerek en başta gelen ROS kaynaklarından biri özelliğini taşımaktadır. Açlık (otofajinin potansiyel tetikleyicisi) faktörünün ROS seviyesini arttırdığı ve anti- oksidantlar ile yapılan tedavinin ise açlık ile meydana gelen otofajide iyileşme görülmesi rapor edilmiştir. ROS' un otofajiyi düzenlediği bir yolda Atg4 proteininin Atg8 proteini etkisi üstündeki rolü olabilir. Atg8/LC3 protein lipidasyonu otofajinin başarılı bir şekilde tetiklenmesi için en temel gerekliliklerden biridir. Atg4 proteini hem Atg8 proteininin COOH kısmından kesime hazırlanmasını hem de LC3-II proteini üzerinden lipid moleküllerinin otolizozomların sitoplazmik yüzeyinden kaldırılma görevi ile lipid moleküllerinin geri dönüşümünü sağlar. Önceki reaksiyon, redox tepkimesine bağlı gözüküyor olsa da Atg4 yükseltgenmiş durumda iken inaktif ve Atg8 proteini membrandan kesemez durumdadır. Bundan dolayı oksidatif şartlar altında Atg4 yükseltgenmiş ve inaktif durumdadır. Bu durum Atg8 lipitleşmesine ve böylece de otofajiye başlamasına neden olurken; indirgenmiş Atg4 aktif durumdadır ve Atg8'in lipidlerini uzaklaştırmada görev alır. Atg4'ün redoks tepkimeleri Cys<sup>81</sup>'in yükseltgenmesi ile düzenlenmektedir (Ravikumar ve ark. 2010). Gaucher hastalığı (GD) bir lizozomal depo hastalığıdır ve glukosylseramide (GlcCer)'in farklı vücut hücrelerinde birikmesi ve hücre sel yetmezliklere neden oldukları bilinmektedir. Glukosylseramide (GlcCer) biyolojik membranların bileşeni ve kompleks glikosipingolipidlerin (GSLs) biyo yapım ve yıkım yollarında önemli ara basamak moleküllerinden biridir. (GlcCer)'in Gaucher's hastalığında birikimi ciddi patolojik sonuçlara neden olmaktadır. Seramid ve GSL sinyal iletim yollarına dahil olarak ROS' a sebep olurlar. Özellikle laktosilseramide ve GD3 moleküllerinin (yolakta GlcCer'in alt tarafında yer alır) Gaucher dokularında birikimi gözlenmiş ve farklı oksit indirgenlerini aktive ettiği rapor edilmiştir, bundan dolayı GSL yolağındaki dengesizliklerin GD'nin temel ROS seviyesini GD hücrelerinde arttırması olarak karakterize edilmiştir. Birçok kanıt gösteriyor ki GD patolojisi hücre içi redoks durumunun bozulması ile ilişkilendirilmiştir. Fibroblast hücrelerinde ROS seviyesinin ve karbonil içeriğinin GD hastalarında önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Oksidatif strese karşı adaptif cevaplarda APE1/Ref-1 proteininin önemli rolü olduğu anlaşılmıştır. Sitoplazmik APE1/Ref-1 protein seviyesi GD fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-



1 proteini kontrol gruplarına göre önemli miktarda fazla olduğu gösterilmiştir (Deganuto ve ark.2007). Çalışmalarımız sonucunda elde ettiğimiz HexA<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinde görülen GM2 gangliosit miktarındaki artışa bağlı olarak, ROS' un hücre ölümünden sorumlu mekanizmalardaki ikincil rolü olup olmadığı araştırılmıştır.

## 2.5. Lizozomal Depo Hastalıkları ve İkincil Yağ Metabolizması

Lizozomal depo hastalıklarında lizozomda biriken birincil depo materyallerinin yanı sıra hücrelerde ikincil ürünlerde birikir. Genellikle protein eksikliği ile ikincil depo ürünü arasında direkt bir ilişki gösterilmemiştir. Glukosfingolipidler (GSLs), fosfolipidler ve kolesterol en fazla çalışılan ikincil depo ürünleridir. Biriken bu lipidler farklı lizozomal depo hastalıklarında beyin ve iç organlarda farklı bir patern gösterir (Walkley ve ark., 2004).

Endozomal/lizozomal sistemin temel rolü hücre yüzeyinden gelen substratların parçalanması ve hücre yüzeyine geri döndürülmesidir. Bu sistem endositosis ve otofaji ile sağlanır. Herhangi bir lizozomal enzimdeki eksiklik tüm bu sistemin fonksiyonunu bozabilir ve bir çok farklı substratın birikmesine sebep olabilir. Tay-Sachs hastalarının beyin dokusundan yapılan çalışmalarda birincil depo ürünü GM2 gangliositinin yanında GA2, Laktosilseramit ve glukoserebrosid gibi ikincil yağ ürünlerinde biriktiği gösterilmiştir. Bu hastalarda ayrıca fosfolipid, serebrosid, sfingomiyelin, kolesterol ve kolesterol ester gibi ikincil metabolitlerin arttığı da rapor edilmiştir (Walkley ve ark, 2004)

## BÖLÜM 3

### GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 DENEY HAYVANLARININ HAZIRLANMASI

##### 3.1.1. Çiftleştirme ve Genotiplendirme

*Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> kolonisini (bu fareler kısır oldukları için) kendi aralarında tek bir gen için heterozigot ve/veya diğer gen için homozigot fareleri çiftleştirerek elde edilmiştir. Bu amaçla *Hexa*<sup>+/-</sup>*Neu3*<sup>+/-</sup> dişi ve erkeklerin yanı sıra *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>+/-</sup> dişi ve erkekler ile *Hexa*<sup>+/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> dişi ve erkekleride çiftleştirme yoluna gittik. Araştırmamız süresince *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> olacak şekilde 4 farklı genotip ve 2 farklı yaş grubunda (2.5 aylık ve 4.5 aylık) deney grupları oluşturulmuştur. Fareler kuyruklarından izole edilen DNA ve Tablo 1'deki primerler kullanılarak PZR ile genotiplendirilmiştir (Phenauf ve ark, 1996; Yamaguchi ve ark. 2012.)

Hexa	+/+ alel	5'-GGCCAGATACAATCATACAG-3'
	+/- alel	5'-CACCAAAGAAGGGAGCCGGT-3'
	-/- alel	5'-CTGTCCACATACTCTCCCCACAT-3'
Neu3	+/+ alel	5'-CTCTTCTTCATTGCCGTGCT-3'
	+/- alel	5'-GCCGAATATCATGGTGGAAA-3'
	-/- alel	5'-GACAAGGAGAGCCTCTGGTG-3'

**Tablo 1.** Genotipleme için kullanılan primerler

#### 3.2. ÖNCÜL (PRİMER) FİBROBLAST HÜCRE HATTININ KURULMASI VE IMMORTALİZASYONU

Projemiz kapsamında 4 farklı genotipte (*WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup>) özellikle 4.5 aylık farelerden öncül fibroblast hücre hatları kurulup ve bu hücreler ölümsüz hale getirilmiştir. Fare fibroblast hücre hatları steril şartlarda deriden elde edilen biyopsi örneklerinden kurulmuştur. Biyopsi örneği 25 cm<sup>2</sup> hücre kültür kapları içinde DMEM (+ 10% FBS+ Antibiyotik) ile %25-40 yoğunluğa kadar büyütülmüştür. Öncül hücrelerin immortalizasyonu için ATCC'den alınan PA317 LXS<sup>N</sup> 16E6E7 adlı paketleme hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattı bir retrovirus vektörü olan pLXS<sup>N</sup>16E6E7'in Psi-2 ekotrofik hücre hattına verilmesi ile elde edilmiştir. İçinde vektör bulunan paketleme hücreleri %50-75 yoğunlukta antibiyotiksiz ortamda büyütülmüştür. Bu hücrelerden büyüme solüsyonu toplanıp

0.45 uM filtreden geçirilip, tavsiye edilen oranda seyreltilmiştir. Daha sonra finalde 4 µg/ml olacak şekilde polybrene eklenmiştir. Virus/polybrene solüsyonu öncül fibroblast hücrelerine eklenip ve 37°C 2 saat inkübe edilmiştir. Daha sonra finalde 4 µg/ml olacak şekilde polybrene DMEM solüsyonuna eklenip 5 saat inkübe edilmiştir. Hücreler çeşitli dilüsyonlarda bölünüp ve neomycin eklenerek seçilmiştir.

### **3.3. HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZ) ANALİZLERİ**

Projemizin bu bölümünde amacımız sinir dejenerasyondan sorumlu olduğunu düşündüğümüz hücre ölümü (apoptoz) üzerine yoğunlaşmak ve artan GM2 ganglioside birikimine bağlı olarak apoptozu araştırmaktır. DNA fragmentasyon ve in situ tunel analizleri yanı sıra apoptoz ile bağlantılı gen ifadelerini analiz ettik. Ayrıca immunohistokimyasal ve western blot analizleriyle protein düzeyinde apoptoz genlerini araştırdık.

#### **3.3.1. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi**

4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipteki fare korteks ve beyincik dokularının DNA'ları NucleoSpin® Tissue Genomik DNA izolasyon kiti ile kitin önerdiği protokolle izole edilmiştir. İzole edilen DNA'lar Etidyum bromür (0.4 µg/ml) içeren %3' lük agaroz jel kullanılarak yürütülüp UV altında incelenmiştir. Farklı genotipteki farelerin korteks ve beyincik dokularının DNA'sı izole edilmiştir. Jelde yürütülen DNA'larda apoptoz sonucu beklenen fragmentler kullanılan yöntem ile gösterilememiştir.

Daha sonraki denemede sırasıyla 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipteki fare korteks ve beyincik dokuları farklı deterjanlarla (SDS ve/veya TritonX) hazırlanan lizis solüsyonları (20 mM Tris-HCl, pH8.0, 5 mM EDTA, 0.1 M NaCl, % 0.5 SDS veya %0.2 TritonX) içerisinde mekanik olarak homojenize edilmiştir. Örnekler 37°C de 1 saat boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Solüsyona 25mg/ml proteinaz K eklenip 50°C de 12 saat boyunca su banyosunda bekletilmiştir. Örnekler üzerine fenol/kloroform (1:1) eklenip santrifüjle (15.000 rpm 5 dk) üstte kalan DNA fazı yeni ependorf tüpe alınmıştır. Daha sonra DNA'lar izopropanol ve amonyum asetat ile çöktürülüp %70 etanol ile yıkanmıştır. İzole edilen DNA lar Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH:8.0) çözülmüştür. DNA'lar etidyum bromür (0.4 µg/ml) içeren %1.5 ve %1.8 agaroz jel kullanılarak, 1XTBE (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2.5 mM EDTA, ph:8.0) tampon içerisinde 25V da gece boyunca ve 60V da 3 saat olarak yürütülmüştür. Bantlar UV altında incelenmiştir. Jelde yürütülen DNA'larda bu yöntem ilede apoptoza bağlı fragmentler gözlenmemiştir.

Bir sonraki denemede DNA fragmentasyonu için 2.5 ve 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipli hayvanların korteks beyin bölgeleri alınıp 500 ul lysis buffer ve 12 ul Proteinase K eklendikten sonra dokular homojenizatör ile parçalanıp 37oC' de 16 saat boyunca inkübe edilmiştir. Örneklerin üzerine 500 µl fenol: kloroform: izoamil alkol (25:24:1) karışımı eklenip, vorteks yapıldıktan sonra 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj yapılmıştır. Süpernatant yeni bir tüpe alınıp üzerine bir hacim kadar kolroform eklendikten sonra 10 dakika boyunca 13000 rpm' de santrifüj yapılmıştır. Bu aşamalardan sonra 3 molar NaOAc (0,1 x sample hacmi) ve %100 etanol (2,5 x sample volume + NaOAc) örneklerin üzerine eklenmiştir. DNA'nın çöktürülmesi için örnekler -20oC de 16 saat boyunca bekletilmiştir. Bekleme süresinden sonra örnekler 4oC' de 30 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Pellet kısmına %70 etanol (150ul) eklendikten sonra tekrar 4oC' de 10 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüj edilip kuruması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Etanol tamamen uzaklaştırıldıktan sonra pellet (DNA) üzerine 100 µl TE buffer eklenip DNA çözünmesi sağlanmıştır. DNA örnekleri yükleme boyası ile karıştırılıp %3'lük agaroz jelde 35V'de yürütülmüştür. Jelde yürütülen DNA'larda apoptoza bağlı fragmentler UV altında incelenmiştir.

### 3.3.2. In situ Apoptoz Analizi (Tunel)

Apoptoz analizleri için anestetik ile uyuşturulan 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fareleri kalpten perfüzyon metodu kullanılarak fikse edilmiştir. Fikzasyon sonucu çıkartılan beyin, bir gece %4 paraformaldehitte, devamında 2'şer saat %10 ve %20 ve bir gece %30'luk sükrozda tutulmuştur. İnce kesitler alabilmek amacı ile OCT içeren bloklar içine gömülüp ve -80°C'de saklanmıştır. Laboratuvarımızda bulunan Leica Cryostat (CM1850-UV) cihazı kullanılarak, -20°C sıcaklıkta 10 mikron kalınlığında kesilmiş ve alınan kesitler poli-lizin kaplı lamalar (slayt) üzerine aktarılmıştır. Boyama yapılacağı zaman slaytlar -80°C'den çıkartılmış ve buz üzerinde yarım saat bekletilmiştir. Apoptotik hücreleri belirlemek için millipore marka ApopTag® Floresan In Situ Apoptosis Tespit Kiti kullanılmıştır. ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Tespit Kitinin üreticisine tavsiye ettiği metot izlenmiştir. Bu metot kısaca şöyledir; beyinler %1 PFA (PBS te çözülmüş) içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında beklenilmiştir. 2 defa 1x PBS ile yıkandıktan sonra etanol:asetik asit (2:1) içerisinde 5 dakika -20 °C'de bekletilerek dokular sabitlenmiştir. Denge solüsyonu ile inkübe edilen slaytlar TdT enzim solüsyonu eklenerek 1 saat 37 °C parçalanmış DNA'nın tanımlanmasına izin verilmiştir. Yıkanan slaytlar kitin içerisinde yer bulunan ikincil antikor kullanılarak parçalanmış DNA'ların yeşil renkte gözlemlenmesi sağlanmıştır. Çekirdeği

tanımlamak için Propidium İyodür kullanılmıştır. Slaytların Floresan Mikroskop (Olympus BX53) ile fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.3.3. MB Analizler (Gen ifade Analizleri)

2.5 ve 4.5 aylık 3'er adet *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipteki farelerden alınan analiz edilene kadar -80oC'de saklanan korteks, beyincik, hipokampus ve talamus dokuları Trizol (Geneaid) ile homojenize edildi ve total RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lar daha sonra High Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (AB) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) kullanılarak Roche – LightCycler® 480 sistemi ile Tablo 2' de dizisi verilen ER stres ile ilişkili **ATF6**, **calnexin** ve **XBP1**; oksidatif stres ile ilişkili **SOD2**, **Catalase** ve **TTase1**; apoptoz regülasyonu ile ilişkili **Bax**, **Bak**, **Bcl-XL** ve **Bcl-2** genlerinin ifade düzeyleri laboratuvarımızda bulunan Roche marka Real Time cihazı kullanılarak karşılaştırıldı. Kontrol olarak GAPDH geninin ifade düzeyine bakıldı. İstatiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Gen	Primer dizisi	PZR ürünü (bp)
ATF6	F:5'- TGG AAG TGG GAAG ATCGGGA -3' R:5'- AGGACAGAGAAACAAGCTCGG -3'	354
Calnexin	F:5'- ATTGCCAACCCCAAGTGTGA -3' R:5'- TCCAGCATCTGCAGCACTAC -3'	362
XBP1	F:5'- TCCGCAGCACTCAGACTATG-3', R:5'- GACTCTCTGTCTCAGAGGGGA-3'	360
SOD2	F:5'- GTGTCTGTGGGAGTCCAAGG-3', R: 5'- CCCAGTCATAGTGCTGCAA-3'	339
Catalase	F:5'- TTCGTCCCGAGTCTCTCCAT-3', R: 5'- GAGGCCAACCTTGGTGAGA-3'	351
TTase1	F:5'- CTGCAAGATCCAGTCTGGGAA-3', R: 5'- CTCTGCCTGCCACCCCTTTTAT-3'	322
Bcl-2	F:5'- CGCAGAGATGTCCAGTCAGC-3', R: 5'- TATGCACCCAGAGTGATGCAG-3'	369
Bcl-XL	F:5'- TCAGCCACCATTGCTACCAG-3', R: 5'- GTCTGAGGCCACACACATCA-3'	356
Bax	F:5'- AGGATGCGTCCACCAAGAAG-3', R: 5'- CTTGGATCCAGACAAGCAGC-3'	306
Bak	F:5'- GCTTTAGCAAACAGGCACCC-3', R: 5'- CCAATGTAGGGAGGGCAAGG-3'	350
GAPDH	F:5'- CCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3', R:5'- ATGCATTGCTGACAATCTTGAG-3'	347

**Tablo 2.** Apoptoz gen ifade analizlerinde kullanılan primer dizileri ve PZR ürünlerinin uzunlukları

### 3.3.4. Western Blot Analizleri

2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerden alınan korteks ve beyincik, bölgelerinde **Kaspaz 9**, **Kaspaz 12** ve **Kaspaz 3** ayrıca korteks, beyincik, talamus ve hipokampus bölgeleri için de **Bip**, **Fas** ve **TNFR1** proteinlerinin ifade düzeyleri çalışılmıştır. Dokulardan izole edilen proteinler eşit miktarda (20ug) olacak şekilde %10luk SDS jele yüklenmiş ve sonrasında nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Membranlar %5 süt tozu içeren PBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra anti-Kaspaz 9 (1:1000), anti-Kaspaz 12 (1:1000), anti-Kaspaz 3 (1:1000), anti-Bip (1:1000), anti-Fas (1:2500), anti-TNFR1 (1:1000) ve anti- $\beta$ -aktin(1:1000) birincil antikorları ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membranlar ikincil peroksidazlı antikor (1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve kemilüminesans kullanılarak blotların görüntüsü alınmıştır. Kaspaz 9, Kaspaz 12 ve Kaspaz 3 protein bant yoğunlukları NIH ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş, aktin proteinine göre normalize edilmiş ve istatistiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Kaspaz 12 antikorunun çalışma koşulları optimize edilemediği için bir diğer apoptoz belirteci olan Kaspaz 3 antikoru apoptoz analizlerinde kullanılmıştır.

### 3.4. OTOFAJİ ANALİZLERİ

Projemizin bu bölümünde amacımız *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin farklı beyin bölgelerini (korteks, beyincik, hipokampus ve talamus) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> fareleri ile karşılaştırılarak otofaji mekanizmasının etkilenip etkilenmediği araştırmaktır. Bu amaçla 4 farklı deney (RT-PCR, Western Blot, otofagozom analizi ve IHC) planlanmıştır.

#### 3.4.1. MB Analizler (Gen ifade Analizleri)

2.5 ve 4.5 aylık 3'er adet *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipteki farelerden alınan ve analiz edilene kadar -80oC'de saklanan korteks, beyincik, hipokampus ve talamus dokuları Trizol (Geneaid) ile homojenize edildi ve total RNA izolasyonu yapıldı. RNA'lar daha sonra High Capacity cDNA Reverse Transcription kiti (AB) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. LightCycler 480 SYBR Green I Master Mix (Roche) kullanılarak Roche – LightCycler® 480 sistemi ile Tablo 3'te dizileri verilen otofaji ile ilişkili LC3, Beclin1, p62 ve Lamp2 genlerinin ifade düzeyleri laboratuvarımızda bulunan Roche marka Real Time cihazı kullanılarak

karşılaştırıldı. Kontrol olarak GAPDH geninin ifade düzeyine bakıldı. İstatiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

Gen	Primer dizisi	PZR Ürün (bp)
LC3	F:5'-ACCATGCCGTCCGGAGAAG-3' R:5'CTCTCGAATAAGTCGGACATCTT-3'	79
Beclin-1	F:5'-GAGGAGCAGTGGACAAAAGC-3' R:5'-CAAACATCCCCTAAGGAGCA-3'	133
LAMP2	F:5'- TAACATCAACCCTGCCACAA-3' R:5'- AAGCTGAGCCATTAGCCAAA-3'	75
p62	F:5'-CCTACAGACCAAGAATTACGA-3', R: 5'-GCCACAGCACTATCACAA-3'	88
GAPDH	F:5'-CCCCTTCATTGACCTCAACTAC-3' R:5'ATGCATTGCTGACAATCTTGAG-3'	347

**Tablo 3.** Otofaji gen ifade analizlerinde kullanılan primer dizileri ve PZR ürünlerinin uzunlukları

### 3.4.2. Western Blot Analizleri

2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerden alınan korteks ve beyincik, talamus ve hipokampus bölgelerinde otofaji ile ilişkili LC3, Beclin-1 ve p62 proteinlerinin miktar analizi (Western Blot) yapılmıştır. Dokulardan izole edilen proteinler eşit miktarda (20ug) olacak şekilde %10luk SDS jele yüklenmiş ve sonrasında nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Membranlar %5 süt tozu içeren PBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra LC3 (1:1000), Beclin-1 (1:4000) ve p62 (1:1000) birincil antikoları ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membranlar ikincil peroksidazlı antikor (1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve kemilüminesans kullanılarak blotların görüntüsü alınmıştır. LC3, Beclin1 ve p62 protein bant yoğunlukları NIH ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş, aktin proteinine göre normalize edilmiş ve istatiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.4.3. Otofagozom Analizi

Proje kapsamında 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinden alınarak oluşturulan ölümsüz fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Fibroblastlar öncelikle 24 saat süre ile lam üzerinde büyütülmüştür. Hücreler 1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit içeren 1X PBS ile 1 saat boyunca inkübe edilerek fikse edilmiştir. 1X PBS ile 3 kez 3'er dakikalık yıkamalardan sonra blokama; 1X PBS içinde çözülmüş %10'luk keçi serumu, %4'lük BSA, 0.3M glisin ve %0,3 TritonX ile oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek



yapılmıştır. Daha sonra hücreler %0,5 TritonX içeren 1X PBS ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler gece boyu (16 saat) bloklama solüsyonu içerisinde çözölen LC3 (8 µg/µl, MAB8558) ve LAMP1 (1:500, ab24170) birincil antikolarıyla muamele edilmiştir. Sonrasında hücreler %0,05 Tween20 içeren 1X PBS solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. İkincil antikolar (ab175476, Alexa Fluor®-568 ve ab150077 Alexa Fluor®-488) 1:500 konsantrasyonunda bloklama solüsyonu içinde hazırlanmış ve hücreler üzerine eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler %0,05 Tween20 içeren 1X PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından DAPI içeren yapıştırma medyumunu ile hücrelerin olduğu lamalar slaytlar üzerine yapıştırılıp sabitlenmiştir. Slaytların Floresan Mikroskop (Olympus BX53) ile fotoğrafları çekilmiştir.

#### 3.4.4. IHC Analizleri

İmmünohistokimyasal analizler için 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fareler öncelikle paraformaldehit ile katılaştırılmıştır (fiksasyon). Bu amaçla kalpten perfüzyon metodu kullanılmış ve beyin örnekleri fikse edilmiştir. Öncelikle anestetik ile uyuşturulan farelerin göğüs kafesleri açılarak enjektör iğnesi yardımı ile %0,9 NaCl solüsyonunu kalp ve dolaşım sistemi aracılığı ile tüm dokulara ulaştırılmıştır. Tüm organlardan kan dokusu temizlenmesi sonrasında taze hazırlanan %4 paraformaldehit dolaşım sistemi aracılığı ile organların katılaştırılması için kalpten tatbik edilmiştir. Katılama işlemi sonucu beyin çıkartılmış, bir gece %4 paraformaldehitte bekletildikten sonra dokuda kalan suyun uzaklaştırılması için sükröz gradientine tabi tutulmuştur. 2'şer saat %10 ve %20 sükrözde bekletildikten sonra bir gece %30'luk sükrözde tutulmuş ve sonrasında ince kesitler alabilmek amacı ile OCT içeren bloklar içine gömülmüş ve -80°C'de saklanmıştır. Laboratuvarımızda bulunan Leica Cryostat (CM1850-UV) cihazı kullanılarak, organlar -20°C sıcaklıkta 10 mikron kalınlığında kesilmiş ve alınan kesitler poli-lizin kaplı lamalar (slayt) üzerine aktarılmıştır. Boyama yapılacağı zaman slaytlar -80°C'den çıkartılmış ve buz üzerinde yarım saat bekletilmiştir. Ardından slaytlar 1X fosfatlı tuz solüsyonu (PBS) ile 10 dakika yıkanmıştır. Sonrasında buz soğukluğunda %100 aseton ile 10 dakika yıkanarak hücre zarında porların açılması sağlanmıştır. Daha sonra tekrar PBS ile 5 dakika 2 kez yıkanmış ve diğer işlemlere devam edilmiştir. Bloklama 1X PBS içinde çözölmüş %10'luk keçi serumu, %4'lük BSA ve 0.3M glisin ile oda sıcaklığında nemli ortamda 1 saat bekletilerek yapılmıştır. Ardından LC3 proteini (8µg/µl) ve LAMP1 proteini (1:500) için birincil antikor aynı bloklama solüsyonu içinde çözölen hazırlanmış ve slaytlar üzerine eklenerek tüm gece (16 saat) +4°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında slaytlar 1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanmıştır. İkincil antikolar 1:500 konsantrasyonunda bloklama solüsyonu içinde



hazırlanmış ve slaytlar üzerine eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında slaytlar 1X PBS ile 4 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Ardından DAPI içeren yapıştırma medyumuna eklenmiş ve lamalar ile kapatılarak sabitlenmiştir. Slaytların Floresan Mikroskop (Olympus BX53) ile fotoğrafları çekilmiştir.

### 3.5. REAKTİF OKSİDATİF TÜR (ROS) ANALİZLERİ

#### 3.5.1. Hücre İçi ROS Seviyesinin Belirlenmesi

Hücre içi ROS seviyesi 2'7' –dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA) polar olmayan bileşiğin, floresan olmayan polar yan ürüne (H2DCF) hücre içine girdikten sonra hücresel esterazlar tarafından dönüştürülmesi ile takip edilmiştir. Hücre içi ROS varlığında H2DCF zar-geçirmez ve yüksek floresansa sahip 2'7' dichlorofluorescein (DCF)'e hızlıca yükseltgenir. Mutant ve kontrol farelere ait fibroblast kültürlerinden (birincil ve immortal) pozitif kontrol, negatif kontrol ve deney grubu oluşturulmuştur. Pozitif kontrol grubu 100µM H2O2 içeren serumsuz MEM ile 1 saat inkübe edilmiştir. Ardından pozitif kontrol ve deney grubu 5µM H2DCFDA ile zenginleştirilmiş serumsuz MEM ile; negatif grup ise serumsuz MEM ile 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler 2 kez 1XPBS ile yıkanmış ve tripsin ile toplanmıştır. Toplanan hücreler 5 dakika 1500rpm hızda santrifüj edilmiş ve 600 µl 1XPBS içinde süspansiyon edilmiştir. Her örneğin üçer okuması için hücreler 200'er µl'lik üç tüpe bölünerek FACScan aletinde FACS analizine uygun hale getirilmiş ve ölçümleri alınmıştır. Projemizin bu bölümü İYTE MBG bölümü öğretim üyesi ve proje danışmanı Doc. Dr Ayten Nalbant'ın laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.5.2. Western Blot Analizi

*WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> genotipteki 4,5 aylık farelerden alınarak oluşturulan ölümsüz (immortal) fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-1 ve IKBα proteinlerinin miktar analizi (Western Blot) yapılmıştır. İzole edilen proteinler eşit miktarda (20ug) olacak şekilde %10luk SDS jele yüklenmiş ve sonrasında nitroselüloz membrana transfer edilmiştir. Membranlar %5 süt tozu içeren PBS-T ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra APE1/Ref-1 (1:1000) ve IKBα (1:1000) ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından membranlar ikincil peroksidazlı antikor (1:10000) ile 1 saat oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve kemilüminesans kullanılarak blotların görüntüsü alınmıştır. APE1/Ref-1 ve IKBα protein bant yoğunlukları NIH ImageJ programı kullanılarak ölçülmüş, aktin proteinine göre normalize edilmiş ve istatistiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.5.3. Protein Karbonilasyon Analizi

*Bu bölümde yine 4.5 aylık WT, Hexa-/-, Neu3-/- ve Hexa-/-Neu3-/- farelerinden elde edilen fibroblastlar ile 2.5 aylık ve 4.5 aylık WT, Hexa-/-, Neu3-/- ve Hexa-/-Neu3-/- fare gruplarından alınmış olan korteks ve beyincik bölgelerinden 1%  $\beta$ -merkaptotanol içeren RIPA veya TNN liziz tampon çözeltisi ile protein izolasyonu yapılmıştır. Proteinler üzerinde bulunan karbonil gruplarının 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH) kullanılarak 2,4-dinitrofenilhidrazon'a (DNP-hidrazone) dönüşümü ile proteinlerdeki karbonil miktarının tayini için OxyBlotTM kiti (S7150 OxyBlotTM Protein Oxidation Detection Kit) kullanılmıştır. Elde edilen protein örnekleri, poli-akrilamid jelde yürütüldükten sonra, Western blot tekniğine tabi tutulmuştur. Blotlar gerekli bloklama solüsyonu kullanılıp bloklandıktan sonra DNP'ye özgü birincil antikorda (1:150) inkübe edilmiştir. Birincil antikor sonrasında, blotlar birincil antikora yönelik horseradish peroxidase ikincil antikoruna (1:300) içerisinde inkübe edilmiştir. Karbonillenmiş proteinler kemiluminesant kullanılarak görüntülenip bant yoğunlukları NIH ImageJ programı kullanılarak  $\beta$ -aktin belirteci (1:1000) oranlanarak normalize edilmiştir. İstatistiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.*

### 3.5.4. Immunositofloresan Analizler

Proje kapsamında elde edilen 4 farklı genotipteki 4,5 aylık farelerden alınarak oluşturulan ölümsüz fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Fibroblastlar öncelikle 24 saat süre ile lam üzerinde büyütülmüştür. Hücreler 1X PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra %4 paraformaldehit içeren 1X PBS ile 1 saat boyunca inkübe edilerek fikse edilmiştir. 1X PBS ile 3 kez 3'er dakikalık yıkamalardan sonra bloklama; 1X PBS içinde çözülmüş %10'luk keçi serumu, %4'lük BSA, 0.3M glisin ve %0,3 TritonX ile oda sıcaklığında 1 saat bekletilerek yapılmıştır. Daha sonra hücreler %0,5 TritonX içeren 1X PBS ile 30 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler gece boyu (16 saat) bloklama solüsyonu içerisinde çözülen APE1/Ref-1 (1:500) birincil antikoruna muamele edilmiştir. Sonrasında hücreler %0,05 Tween20 içeren 1X PBS solüsyonu ile 3 kez yıkanmıştır. İkincil antikor 1:500 konsantrasyonunda bloklama solüsyonu içinde hazırlanmış ve hücreler üzerine eklenerek 1 saat inkübe edilmiştir. Sonrasında hücreler %0,05 Tween20 içeren 1X PBS ile 3 kez yıkanmıştır. Ardından DAPI içeren yapıştırma medyumuna hücrelerin olduğu lamalar slaytlar üzerine yapıştırılıp sabitlenmiştir. Slaytların Floresan Mikroskop (Olympus BX53) ile fotoğrafları çekilmiştir. İstatistiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.

### 3.6. İKİNCİL YAĞ METABOLİZMASI ANALİZLERİ

4.5 aylık *WT*, *Hexa-/-*, *Neu3-/-* ve *Hexa-/-Neu3-/-* fareler 150 mM amonyum bikarbonat ile perfüzyon yapılarak organlardan kan uzaklaştırılmıştır. İkincil yağların en yoğun olduğu özellikle hipokampüs ve korteks bölgeleri analiz edilmiştir. 500 ul 150 mM Amonyum Bikarbonat içerisinde çözünen hipokampüs ve korteks dokusu Bradford assay ile protein konsantrasyon ölçümü tamamlandıktan sonra Almanya Dresden de bulunan Lipotype GmbH adlı biyotek firmasına gönderilmiştir. Projemizin bu bölümü hizmet alımı şeklinde gerçekleştirilmiştir. Lipidom kütle spektrometre analizi ile gliserofosfolipid, fosfatidilkolin, fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, fosfatidilinositol, fosfatidilgliserol, diaçilgliserol, triaçilgliserol, Heksosil seramid, Sfingomiyelin, kolesterol ve kolesterol ester gibi ikincil yağların miktarsal analizi yapılmıştır. İstatiksel analizleri yapıldıktan sonra p değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak hesaplanmıştır.



TÜBİTAK

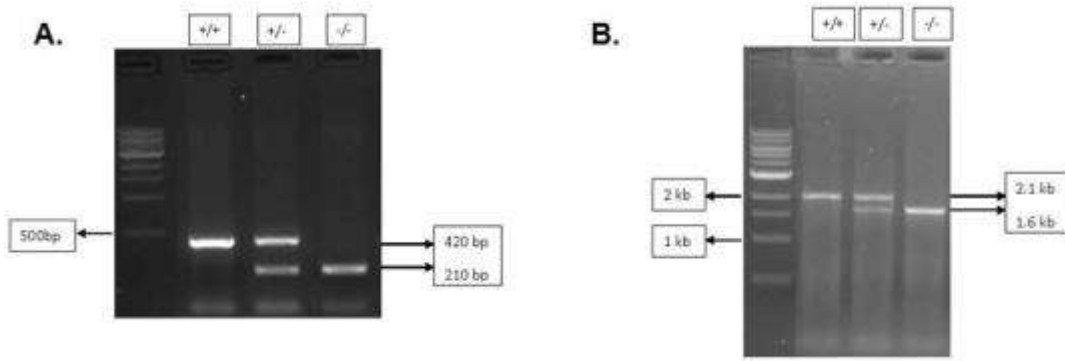
## BÖLÜM 4

### SONUÇLAR

Projemizin amacı 4-4.5 aylıkken anormal GM2 gangliosid birikimine bağlı olarak tremor (titreme) ve ataxia (kas koordinasyon bozukluğu) gibi nörolojik bulgular göstererek aniden ölen erken başlangıçlı (early onset) Tay-Sachs hastalığı fare modelinde hastalık patolojisine sebep olan hücresel mekanizmaları araştırmaktır. Bu amaçla 4 farklı genotipte, 2 farklı yaş grubunda ve 4 farklı farklı beyin bölgesi (korteks, beyincik, hipokampus ve hipotalamus) ile bu farelerden elde edilen fibroblast hücrelerinde otofaji, apoptoz, reaktif oksijen türleri yanı sıra ikincil yağ metabolizması araştırılmıştır.

#### 4.1. Çiftleştirme ve Genotiplendirme

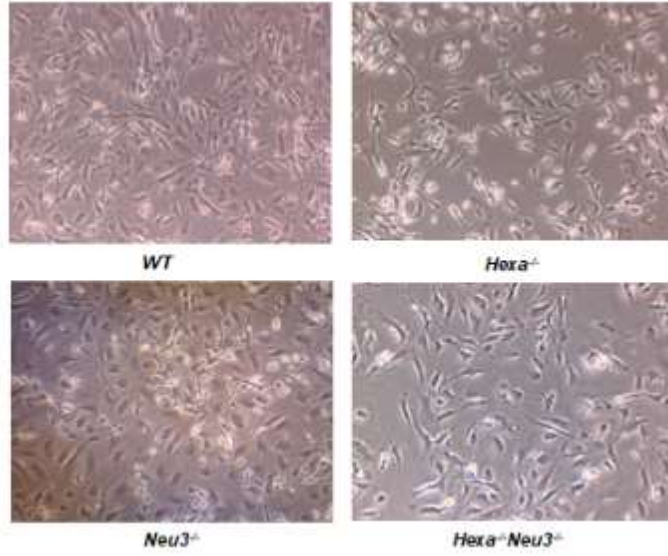
Farelerin homozigot ve heterozigot alellerinin genotiplendirilmesi uygun primerler kullanılarak yapılmıştır. Normal ve mutant aleller için heterozigot (+/-) ve homozigot (+/+) veya (-/-) aleller PZR sonrası agaroz gel elektroforezinde aşağıdaki gibi görüntülenmiştir. Genotiplendirmelerde proje süresince teknik sorunlar (PZR optimizasyonu) dışında herhangi bir sorunla karşılaşılmamış ve başarı gerçekleştirilmiştir (Şekil 1).



**Şekil 1.** +/+, +/- ve -/- farelerin (A) Hexa ve (B) Neu3 genleri için PZR ile genotiplendirilme sonrası jel görüntüsü

#### 4.2. Öncül Fibroblast Hücre Hattının Kurulması ve Immortalizasyonu

4 farklı genotipte (*WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup>) farelerden öncül fibroblast hücre hatları steril şartlarda deriden elde edilen biyopsi örneklerinden kurulmuştur. Bu hücreler ölümsüz hale getirilmiştir ve aşağıda görüntüleri sunulmuştur (Şekil 2). Hücre hatlarının kurulması ve 'immortalize' edilerek devamlılığının sağlanması daha önce laboratuvarımızda uygulanmıştır olup projemiz süresince başarı ile gerçekleştirilmiştir. Hücrelerin bir kısmı sıvı nitrojende daha sonraki çalışmalarımızda kullanılmak üzere saklanmıştır



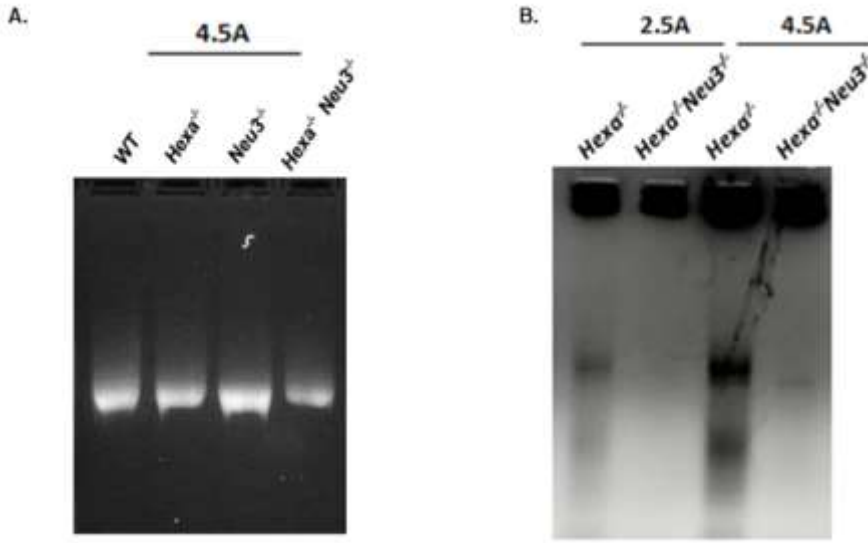
**Şekil 2.** *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> 4.5 aylık farelerden elde edilerek ölümsüzleştirilmiş fibroblastların görüntüsü

#### 4.3. APOPTOZ Analizleri

Projemizin bu bölümünde araştırmamızı apoptoz üzerine yoğunlaştırdık. Lizizomlarda artan GM2 gangliositine bağlı olarak hücre ölümünün bir göstergesi olan DNA fragmentasyonunu farklı beyin bölgelerinde göstermeye çalıştık. Ayrıca apoptoz ile ilgili çeşitli gen ifadelerini (ATF6, Calnexin, XBP1, SOD2, Catalase, Ttase1, BCL2, BCL XL ve Bax) moleküler biyolojik (MB) yöntemlerden RT-PCR ile analiz ettik. Immunohistokimyasal analizler ve western blot yöntemlerini kullanarak apoptoz ile ilişkili genler (Kaspaz 3, 9 ve 12 ile Bip, Fas ve TNFR1) için protein düzeyinde araştırmamızı gerçekleştirdik.

#### 4.3.1. DNA İzolasyonu ve Agaroz Jel Elektroforezi

Yapılan DNA fragmentasyon analizi sonucunda, ilk denemede yapılan fragmentasyon analizinde apoptoza bağlı fragmentasyonlar görülmemiştir (Şekil 3A). Daha sonraki denemede kırılmış DNA'lar agaroz jel üzerinde genomik DNA'dan farklı olarak küçük fragmentler halinde gözlenmiştir (Şekil 3B).

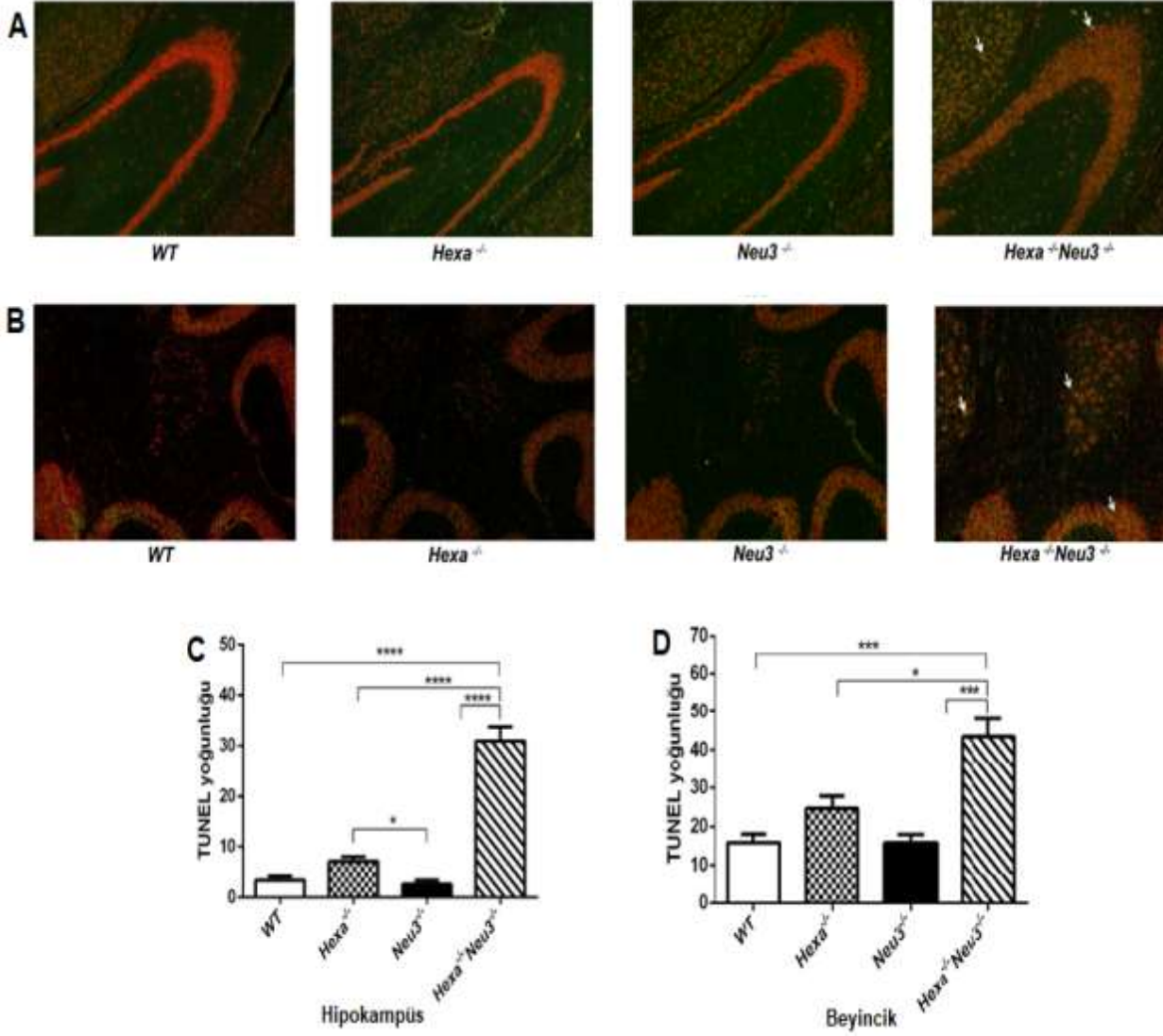


**Şekil 3.** (A) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fare **korteks** dokusundaki genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü. (B) 2.5 ve 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fare **korteks** dokusundaki genomik DNA'nın agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

#### 4.3.2. In situ Apoptoz Analizi (Tunel)

*Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin farklı beyin bölgelerinde lizozomlarda GM2 gangliosid miktarındaki artışın neden olduğu apoptoz mekanizmasını göstermek için TUNEL deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla millipore marka ApopTag® Floresan In Situ Apoptosis Tespit Kiti kullanılmıştır. ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Tespit Kitinin üreticisine göre, kit aracılığıyla DNA iplikçik kopmaları, serbest 3'-OH ucu, modifiye nükleotitlerle enzimatik olarak etiketlenerek tespit edilmeye çalışılmıştır. DNA parçalanması nedeniyle, üretilen yeni DNA uçları çekirdeklerde ve apoptotik gövdelerde morfolojik olarak tanımlanabilmektedir. Bununla birlikte, az miktarda DNA 3'-OH uçlarına sahip olan normal veya proliferatif çekirdekler, genellikle deney sırasında boyanmaz. Bu

yöntem ile apoptozla ilişkili hem tek iplikli hem de çift iplikli kopmalar tespit etmek mümkün olmaktadır.



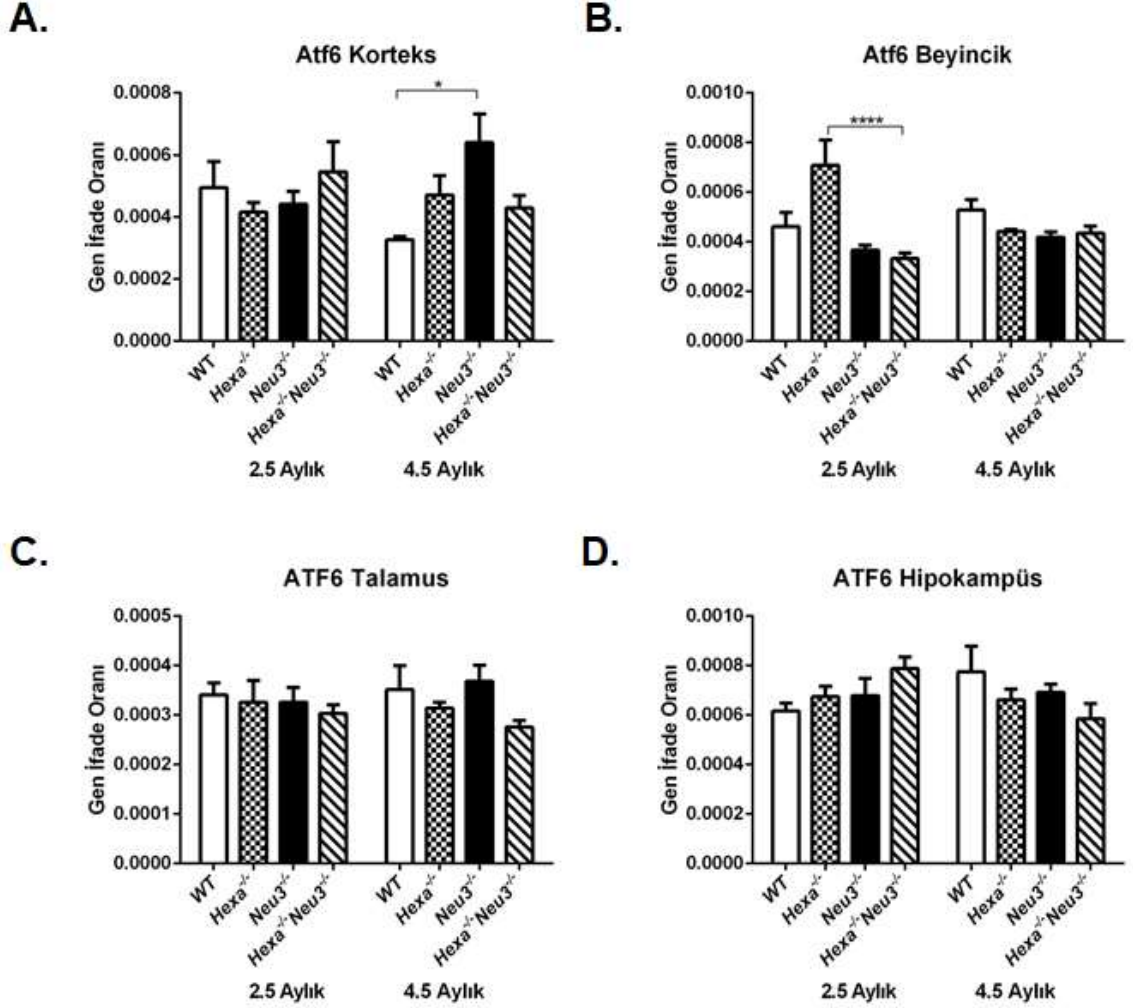
**Şekil 4.** 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin özellikle hipokampus (A) ve beyincik (B) bölgesinde hücre ölümü TUNEL yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Çekirdek kırmızı olarak boyandı. Hipokampus (C) ve beyincik bölgesinde (D) hücre ölümü yoğunluğu istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (n=3; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001).

4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin hipokampus ve beyincik bölgelerinin diğer genotipteki kontrol grubu fareler ile karşılaştırıldığında yüksek hücre ölümü seviyesine sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 4). Yeşil sinyaller apoptozun göstergesidir. Propidium iyodür kullanılarak boyanan



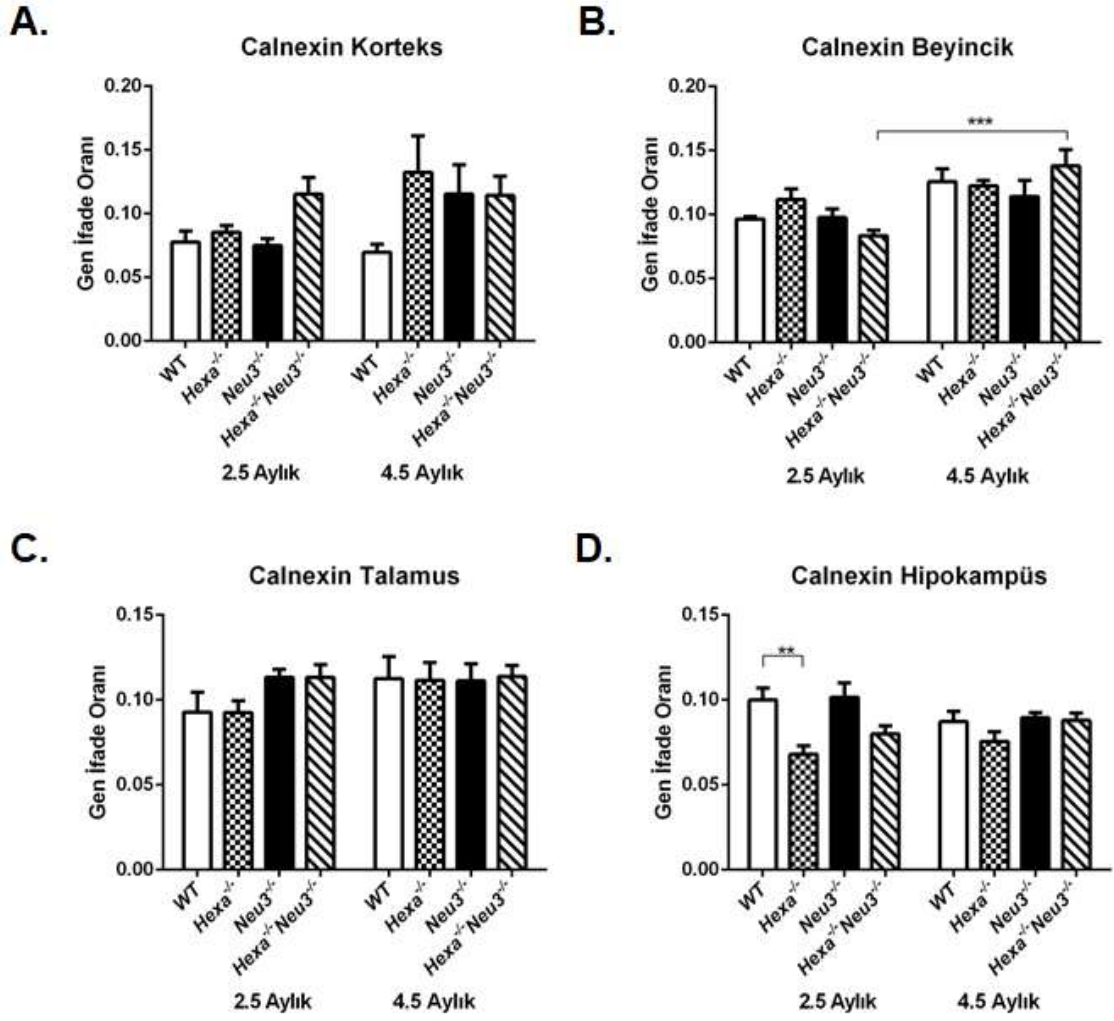
çekirdekler kırmızı olarak gözlemlenmiştir. TUNEL pozitif nöronlar sarı olarak gözlenmiş ve istatistiksel analizler yapılmıştır.

#### 4.3.3. MB Analizler (Gen ifade analizleri)

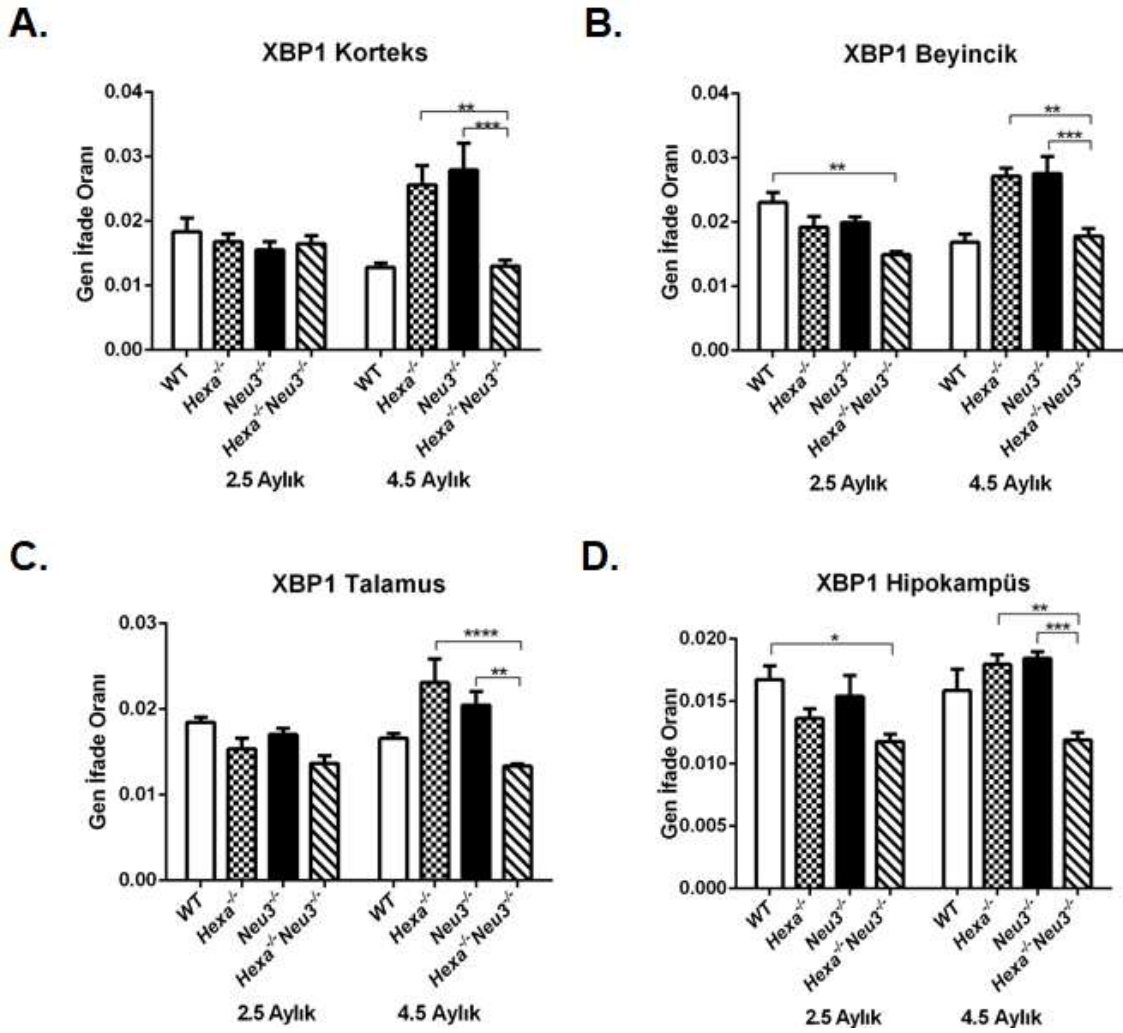


**Şekil 5.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında ATF6 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*\*\*p<0.0001)





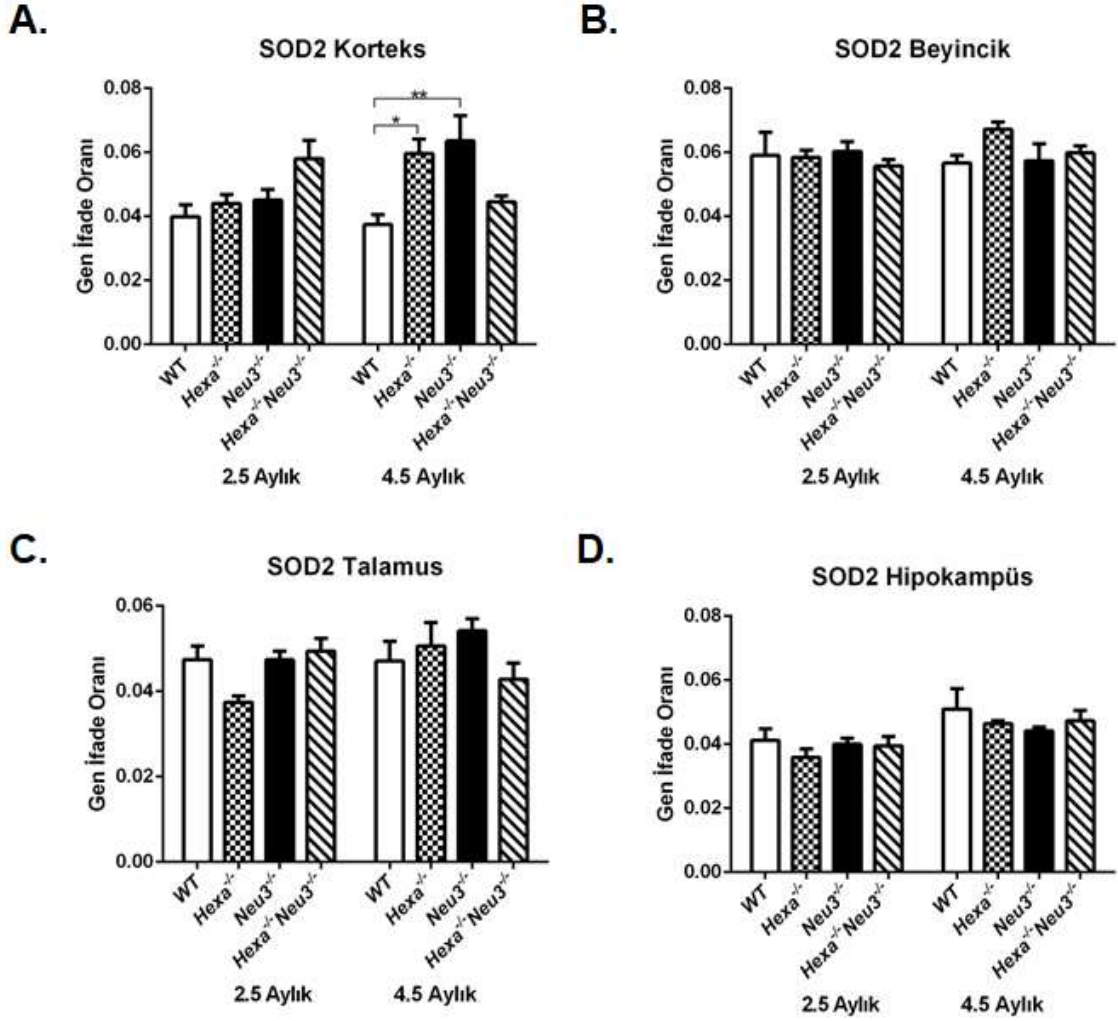
**Şekil 6.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında Calnexin gen ifade oranı (n=3; \*\*\*p<0.001)



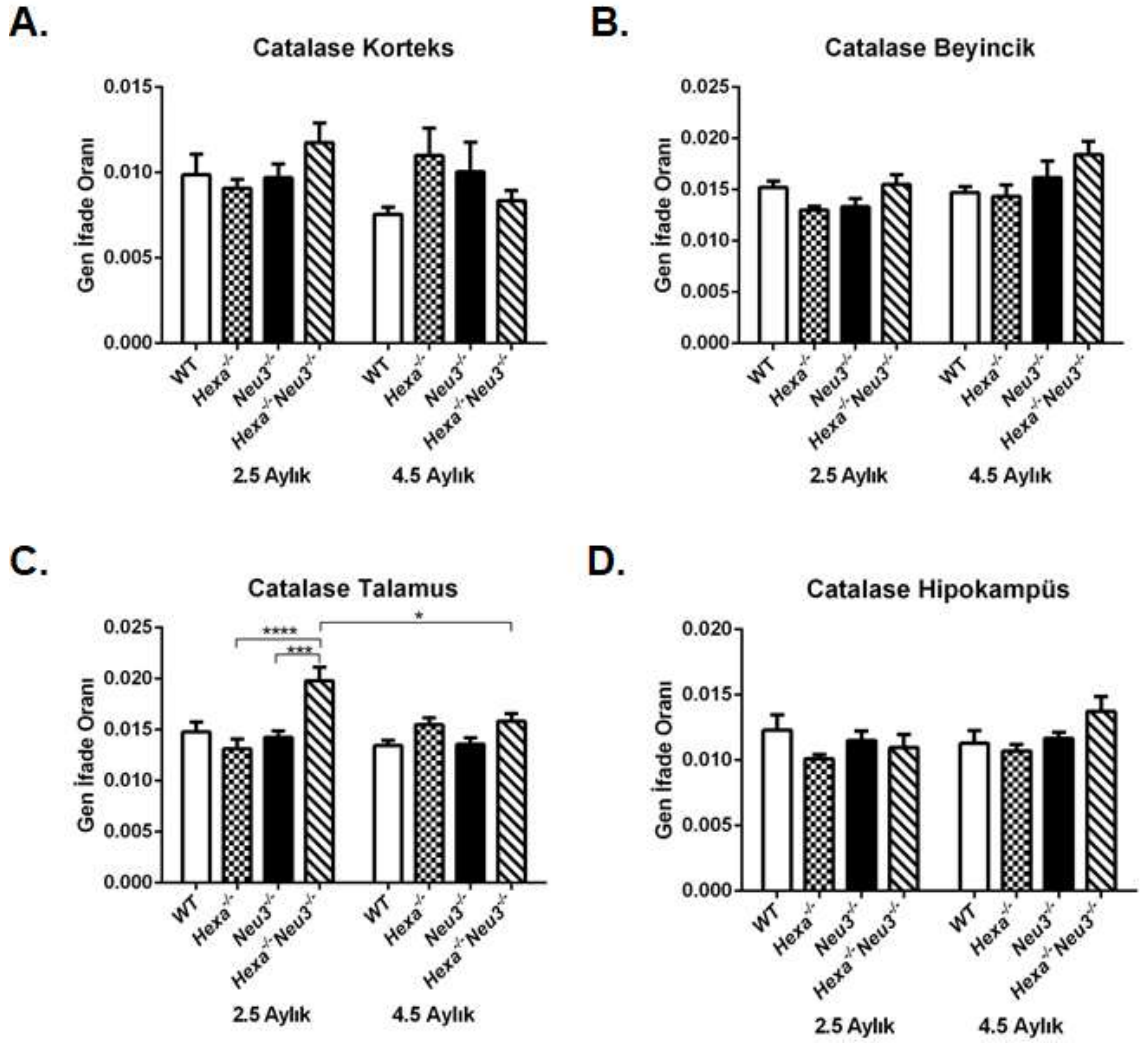
**Şekil 7.** 2.5 ve 4.5 aylık WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup>, Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında XBP1 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

Erken başlangıçlı Tay-Sachs fare modelinde apoptoz ile ilişkili ER stres seviyesini daha iyi anlamak için ATF6, Calnexin ve XBP1 genlerinin ifade düzeyleri çalışılmıştır. Genel olarak ATF6 gen ifade oranında çalışılan bölgelerde Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> faresi için belirgin bir fark gözlenmezken sadece 4.5 aylık Neu3<sup>-/-</sup> farelerin korteks bölgesinde diğer fareler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış görülmüştür. Herhangi bir fenotip göstermeyen Neu3<sup>-/-</sup> farelerde bu gen ifadesindeki artış anlaşılabilir ve sadece bu fareye özgü daha ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir (Şekil 5). Calnexin gen ifade oranı beyincik bölgesi için 4.5 aylık Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> faresinde 2.5 aylık fareler ile karşılaştırıldığında yaşa bağlı anlamlı bir artış gösterirken, diğer bölgelerde belirgin bir fark gözlenmemiştir (Şekil 6). Son olarak kesilmemiş XBP1 gen ifade oranı 4.5 aylık Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> faresi için Hexa<sup>-/-</sup> ve Neu3<sup>-/-</sup> faresi ile karşılaştırıldığında bütün bölgelerde anlamlı bir azalma göstermiştir ancak yaşa bağlı bir düşüştür söz edilememiştir. Ancak 2.5 aylık Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup>

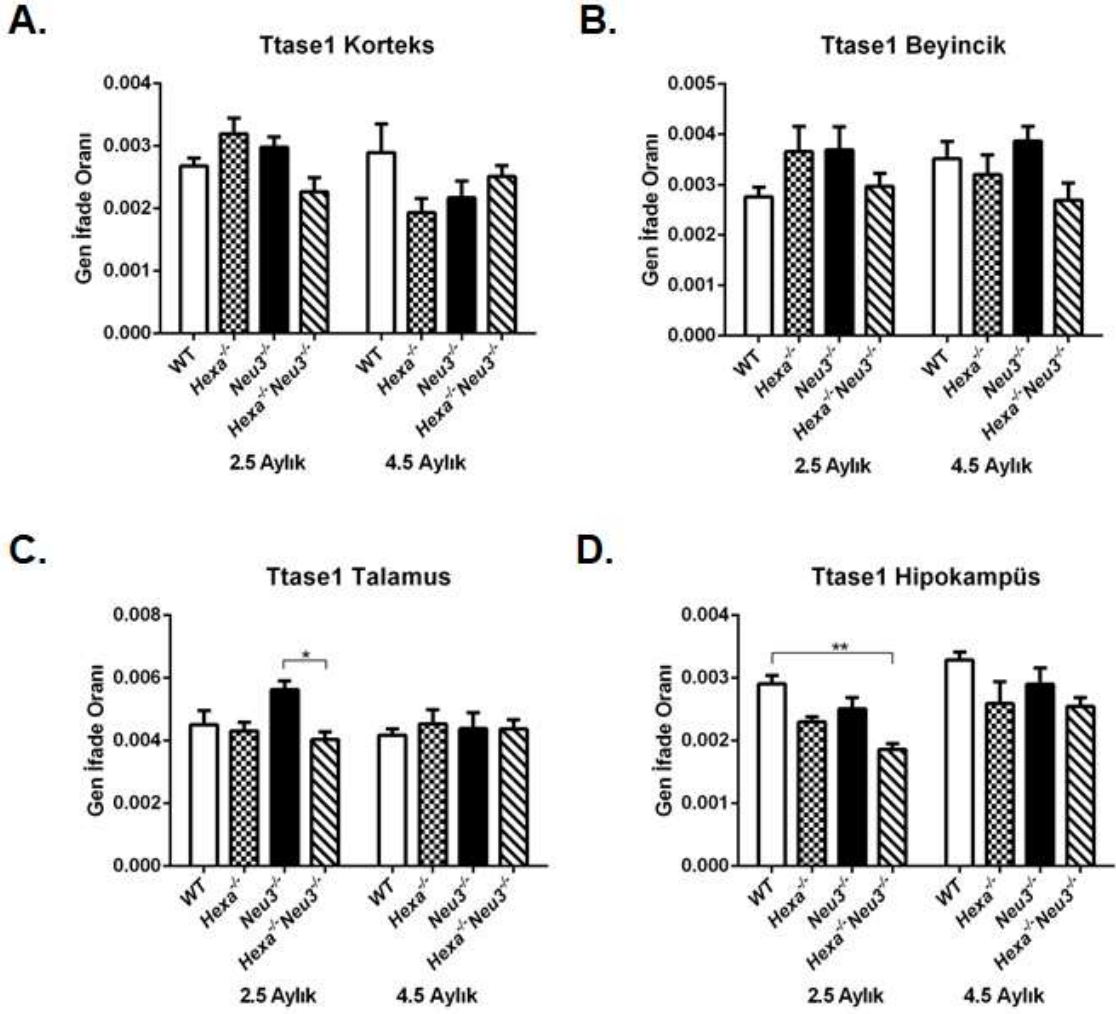
faresinin beyincik ve hipokampüs bölgelerinde de *WT* ile karşılaştırıldığında kesilmemiş XBP1 gen ifade oranı belirgin bir azalma göstermiştir (Şekil 7). Bu kesilmemiş XBP1 gen ifade düzeyindeki azalma ER stres seviyesinde bu yaştan itibaren bir artış olduğunu düşündürmektedir.



**Şekil 8.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında SOD2 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01)



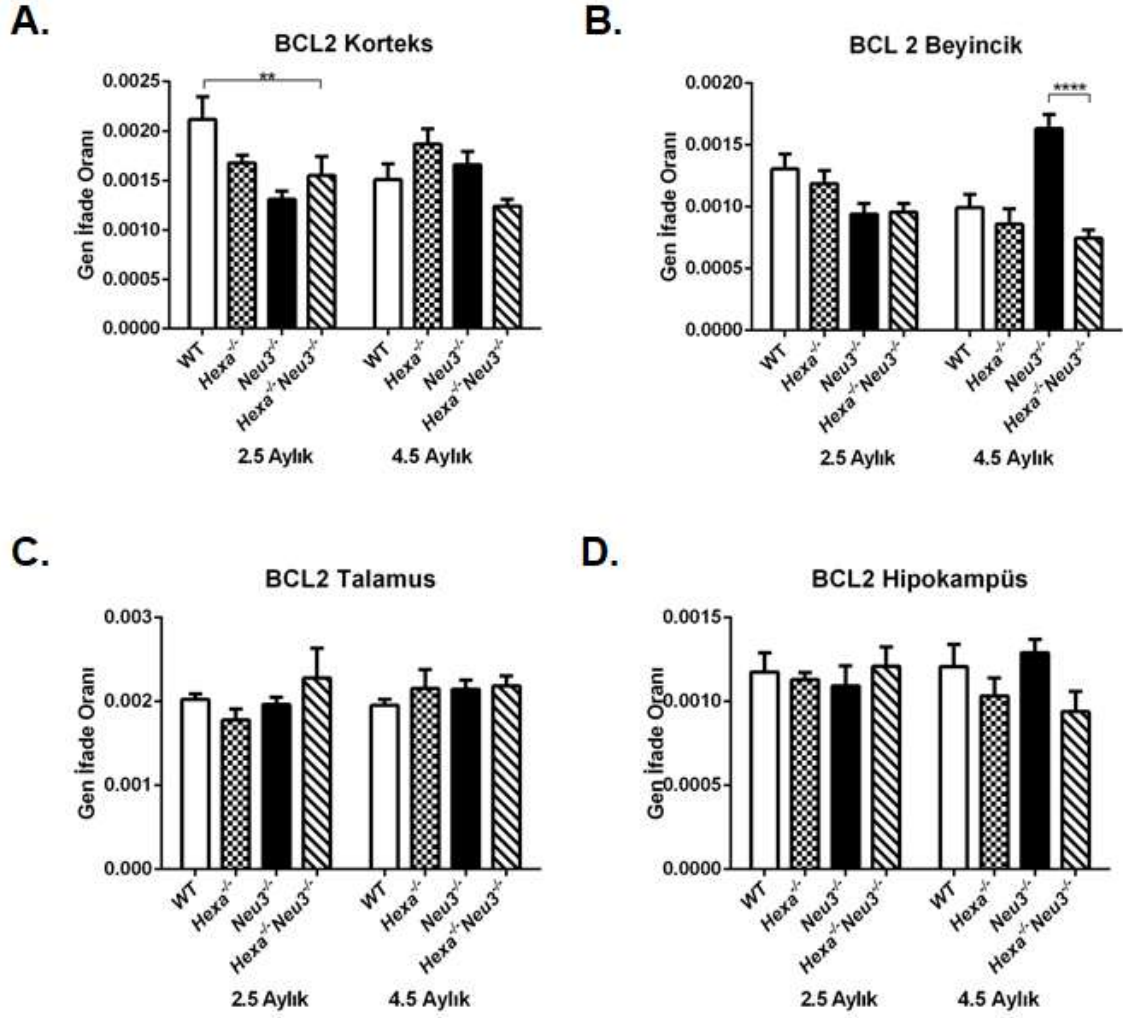
**Şekil 9.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında Catalase gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001)



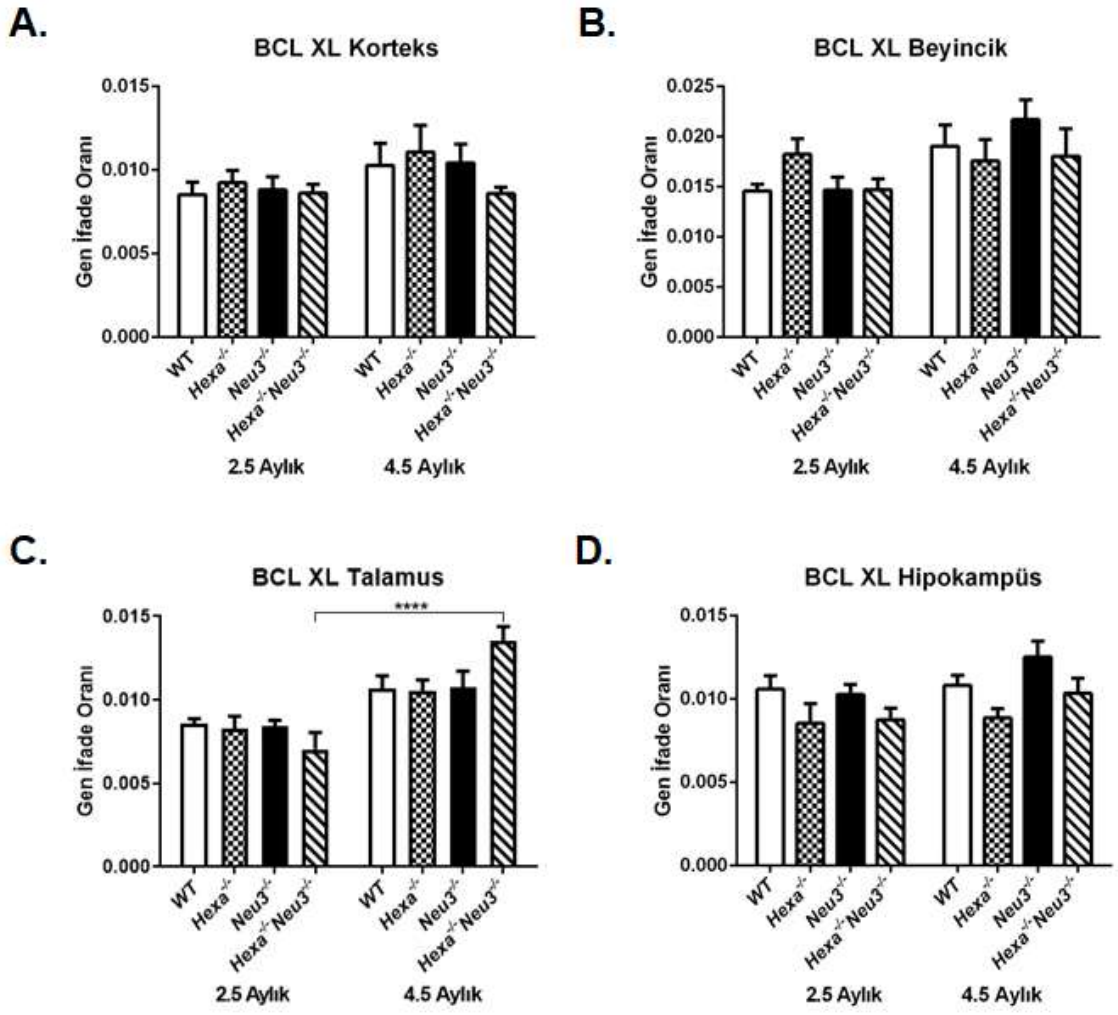
**Şekil 10.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampüs dokularında *Ttase1* gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01).

Oksidatif stres belirteçlerinin (SOD2, Catalase ve *Ttase1*) gen ifade oranları çalışılmıştır. Yaşa ve genotipe bağlı olarak SOD2 aktivitesinde anlamlı fark görülmemiştir. 2.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresi için talamus bölgesinde artan Catalase aktivitesi tesbit edilmiştir ancak 4.5 aylık aynı genotipteki farelerle karşılaştırıldığında azalma olmasına rağmen genotipler arasında fark yoktur. En önemli veri ise 2.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerde *WT* ile karşılaştırıldığında hipokampüs bölgesinde azalan *Ttase1* gen ifade oranıdır ancak 4.5 aylık farelerde önemli bir fark gözlenmediği için bu sonuç anlamlandırılmamıştır (Şekil 8-10) .



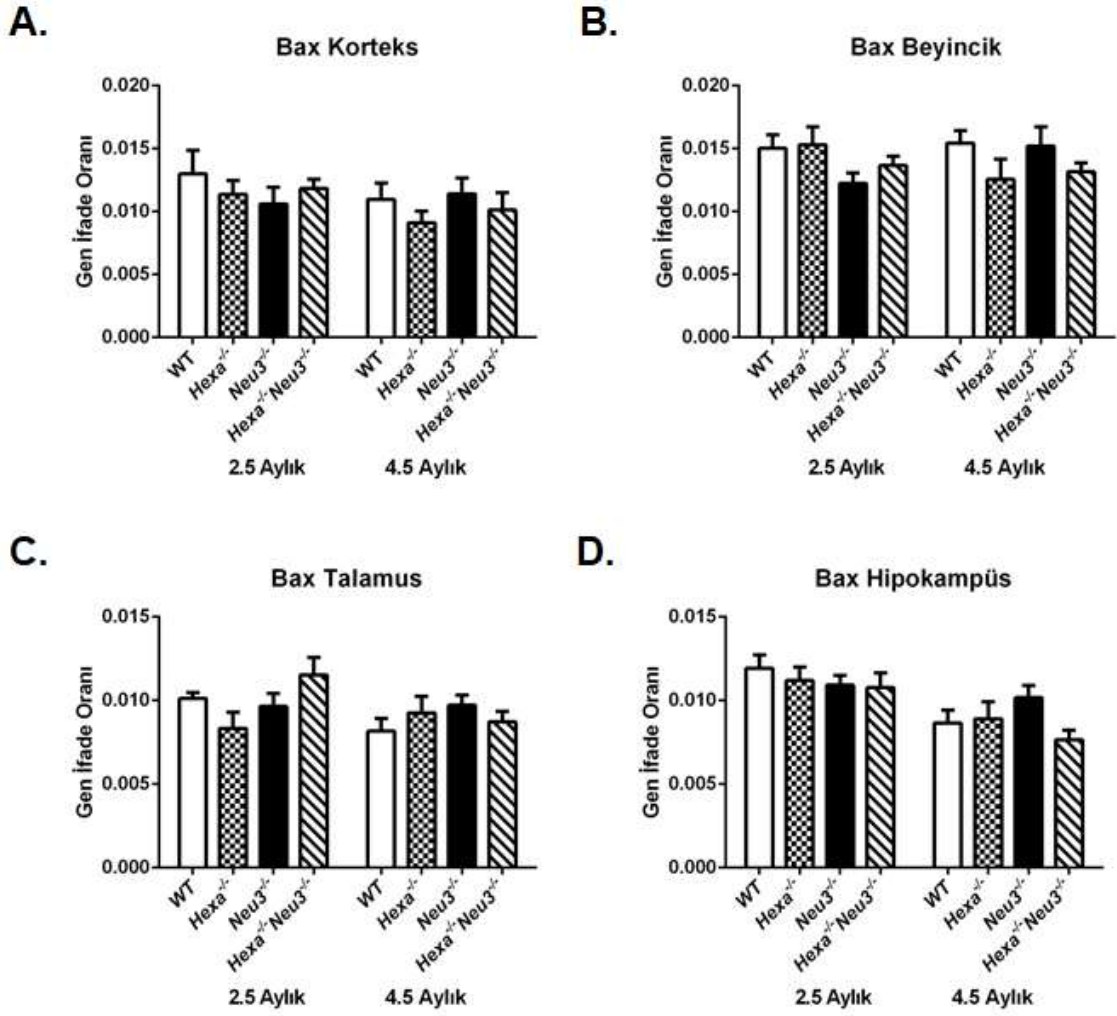


**Şekil 11.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında BCL2 gen ifade oranı (n=3; \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001)



**Şekil 12.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında BCL XL gen ifade oranı (n=3; \*\*\*\*p<0.0001)





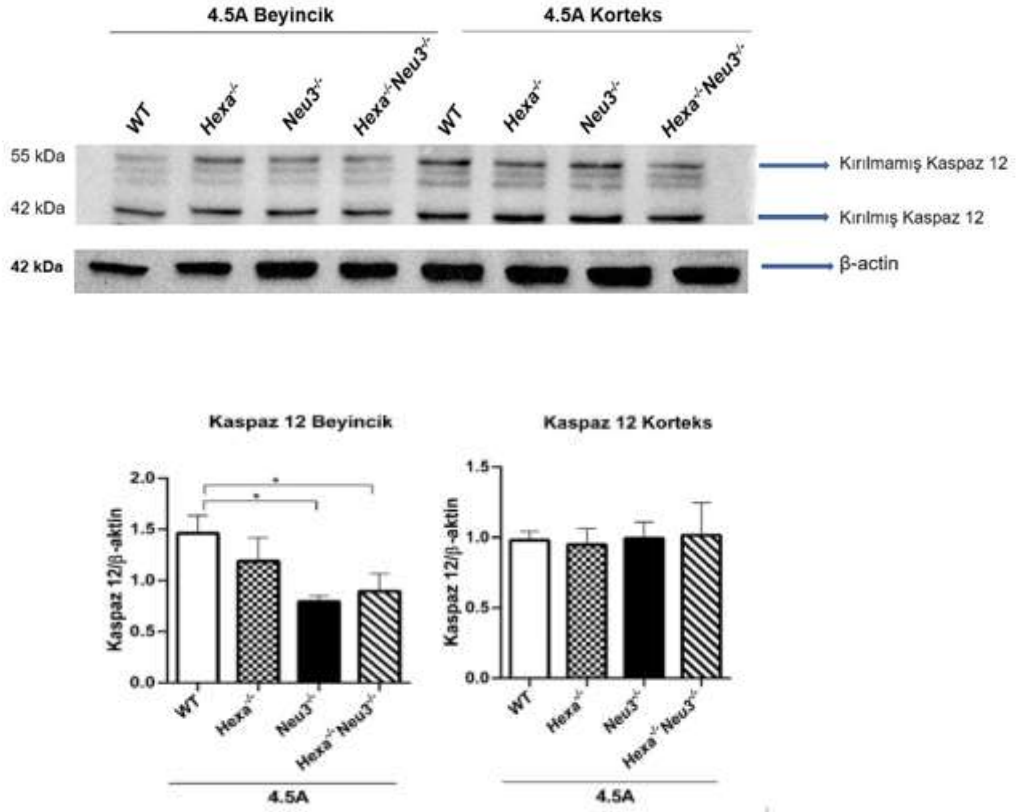
**Şekil 13.** 2.5 ve 4.5 aylık WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup>, Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinde (A)korteks, (B)beyincik, (C)talamus ve (D)hipokampus dokularında Bax gen ifade oranı (n=3)

Apoptoz regülasyonunda rol alan belirteçler (Bcl2, Bcl XL ve Bax) için yapılan gen ifade düzeyi analizleri için genotip (özellikle Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> ve Hexa<sup>-/-</sup>) karşılaştırması ve yaşa bağlı (özellikle 2.5 ve 4.5 aylık Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> karşılaştırması) olarak herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 11-13). Bu genlerin patolojideki olası etkisini daha iyi anlamak için protein seviyesinde analizler yapılabilir. Bak gen ifade oranı ise proje önerisinde olmasına ve optimizasyon 2 farklı primer seti ile yapılmasına rağmen başarı ile gerçekleştirilememiştir. Bu nedenle sonuçlar raporumuza eklenmemiştir.

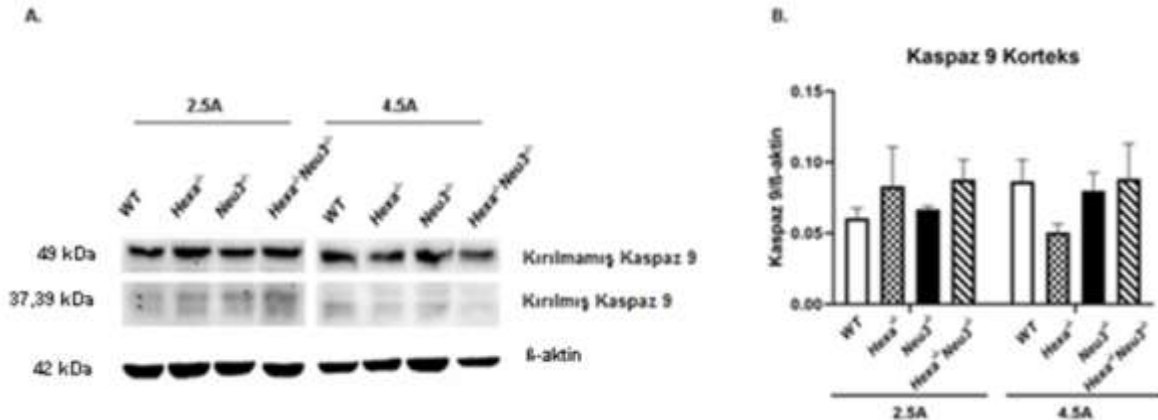
#### 4.3.4. Western Blot Analizleri

Apoptoz ile ilişkili Kaspas 12, 9 ve 3 genleri korteks, beyincik, hipokampus ve talamus bölgeleri protein düzeyinde çalışılmıştır. Sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

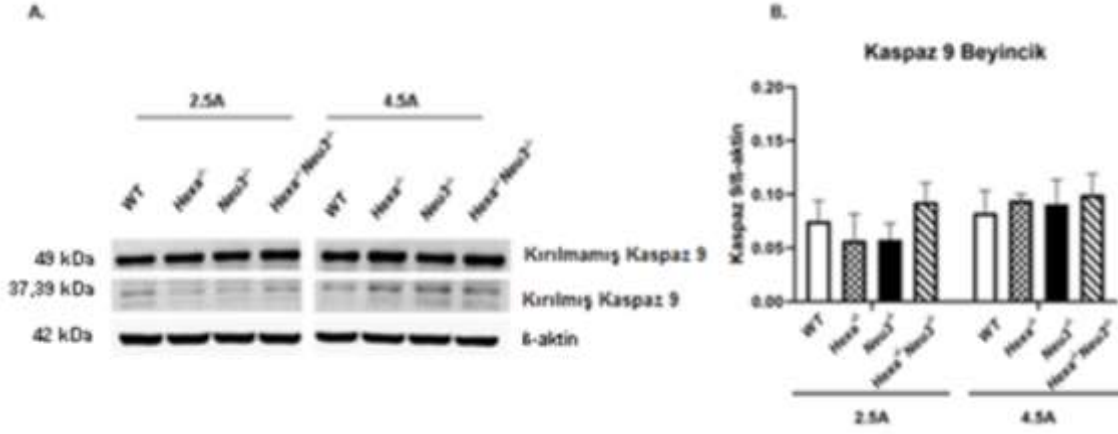
Kaspas 12 analizi sadece 4.5 aylık farelerin korteks ve beyincik dokusunda denenmiştir (Şekil 14). Bu antikorun WB optimizasyonu çok zorlukla gerçekleştirilmiştir. Ancak Kaspas 12 antikoru ile bu iki bölgede 4.5 aylık farelerde fark görülmemiştir. Bunun yanısıra antikorumuz optimizasyon için sık kullanımdan dolayı tükendiği ve yenisini temin edilmesinde bütçemiz yetmediği için hipokampus ve talamus bölgeleri ile 2.5 aylık farelerde planlanan bölgeler çalışılamamıştır.



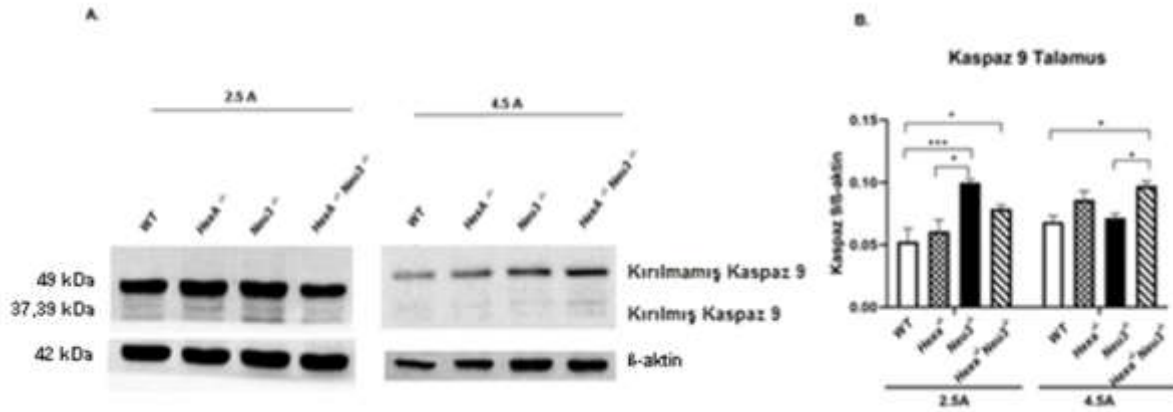
**Şekil 14.** 4.5 aylık WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup>, Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik ve korteks dokusunda Kaspas 12 antikoru için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı (n=3)



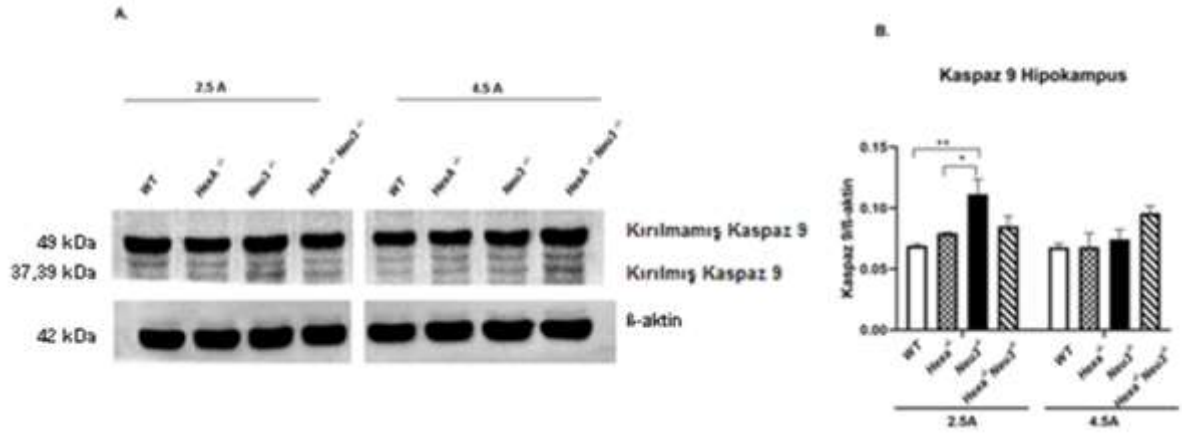
**Şekil 15.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **Korteks** dokusunda **Kaspaz 9** antikoruna karşı Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



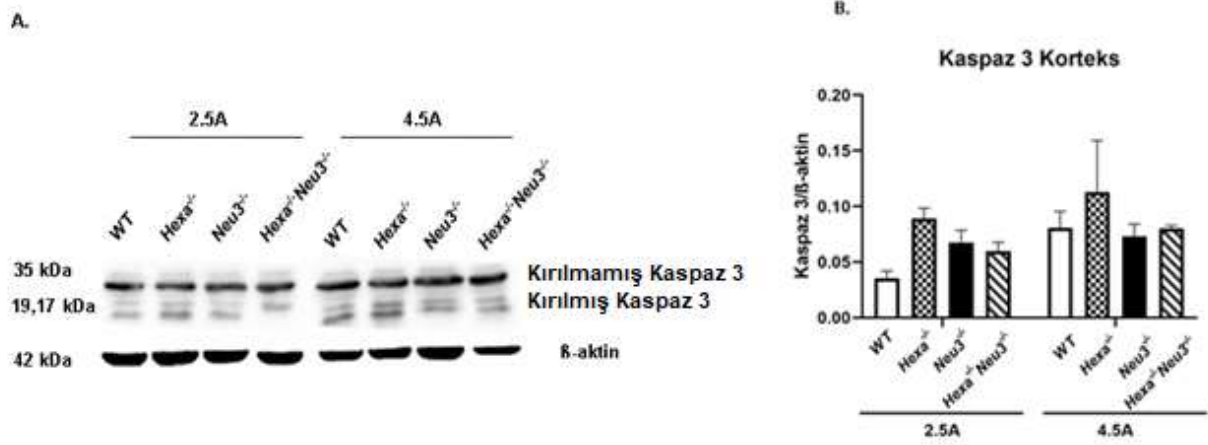
**Şekil 16.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **Beyincik** dokusunda Kaspaz 9 antikoruna karşı Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



**Şekil 17.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda Kaspaz 9 antikoruna karşı Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

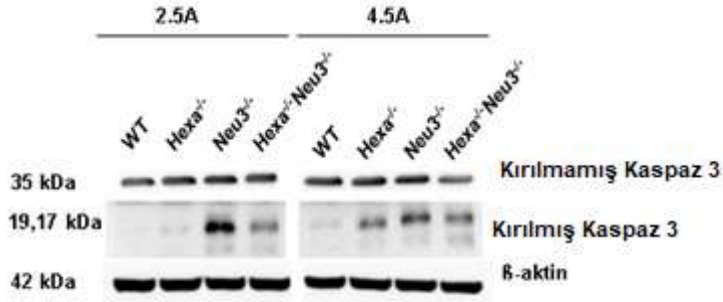


**Şekil 18.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda Kaspaz 9 antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 9 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

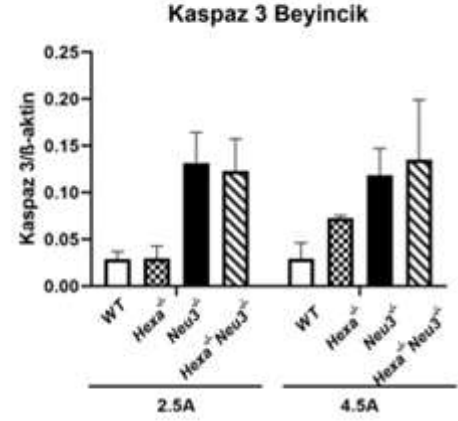


**Şekil 19.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **Korteks** dokusunda Kaspaz 3 antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

A.

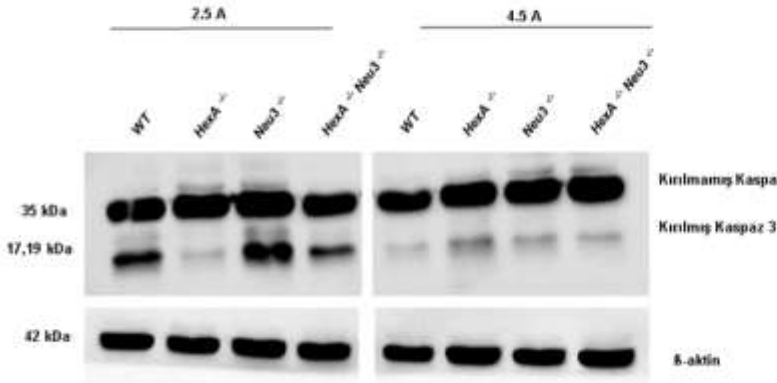


B.

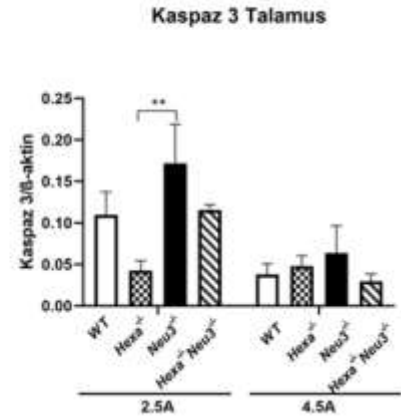


**Şekil 20.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda Kaspaz 3 antikoru için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorumun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorumun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

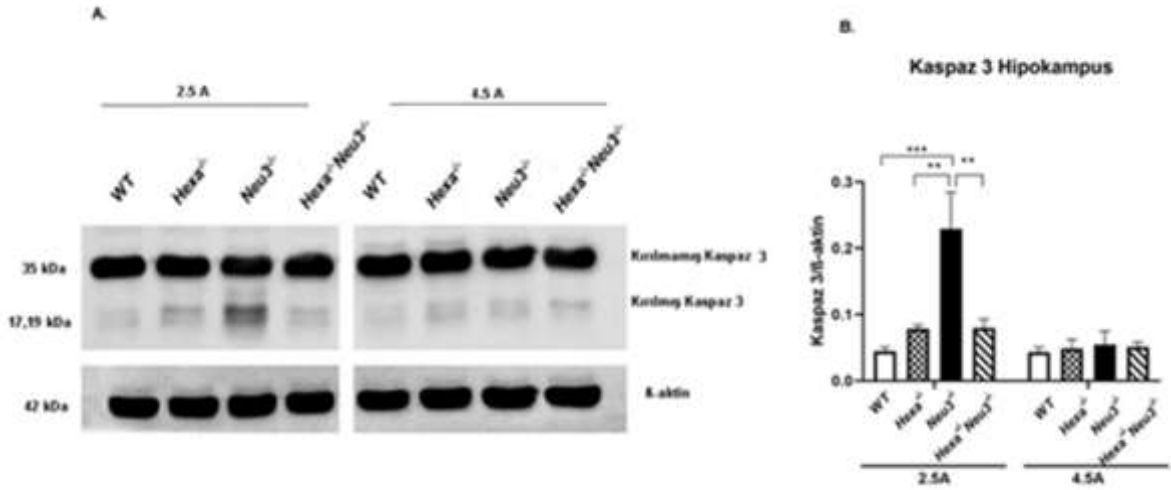
A.



B.



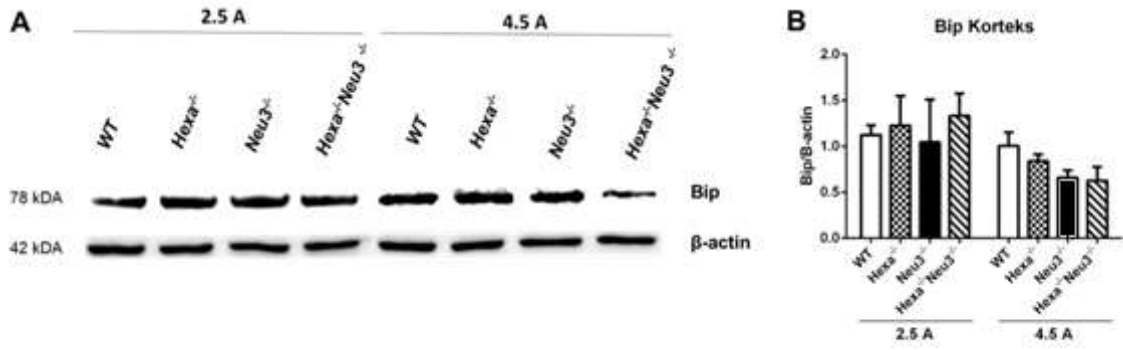
**Şekil 21.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus dokusunda Kaspaz 3 antikoru için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorumun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorumun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*\*p<0.01)



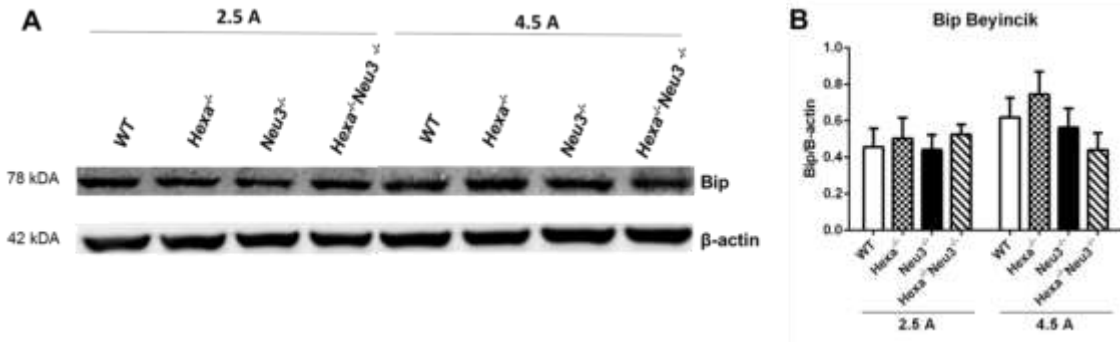
**Şekil 22.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus dokusunda Kaspaz 3 antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Kaspaz 3 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3,\*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001)

Yapılan WB analizleri sonucunda **Kaspaz 12** antikorunda birden fazla bant görüldüğü için kaspaz 12 bandının yeri tam olarak saptanamamış ve istatistiksel analizleri yapılamamıştır (Şekil 14). **Kaspaz 9** proteininde, korteks ve beyincik bölgelerinde yaş grupları ve genotipler karşılaştırıldığında anlamlı bir değişim görülmemiştir (Şekil 15,16) ancak talamus bölgesinde 2.5 ve 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fareleri aynı yaşta WT fareleri ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlemlenmiştir (Şekil 17). Hipokampus bölgesinde talamus bölgesine benzer şekilde 2.5 aylık *Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde WT ve *Hexa*<sup>-/-</sup> fareleriyle karşılaştırıldığında anlamlı artış görülmüştür (Şekil 18). **Kaspaz 3** proteini seviyesi korteks bölgesine bakıldığında genotipler ve yaş gruplarına göre kıyaslandığında belirgin bir fark göstermemiştir (Şekil 19) ancak *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin beyincik bölgelerinde önemli miktarda arttığı görülmüştür (Şekil 20). *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerdeki artışın bu bölgedeki Neu3 sialidaz eksikliği ile bağlantılı olduğu düşünülmüştür. Talamus ve hipokampus bölgelerine bakıldığında ise kaspaz 3 seviyesi 2.5 aylık *Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde aynı yaşta diğer genotipler ile kıyaslandığında anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 21,22).



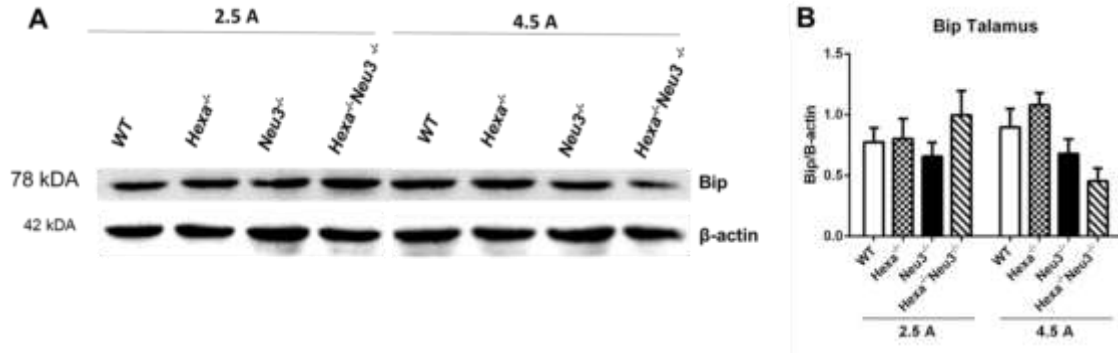


**Şekil 23.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **korteks** dokusunda **Bip** antikoru için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorumun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorumun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

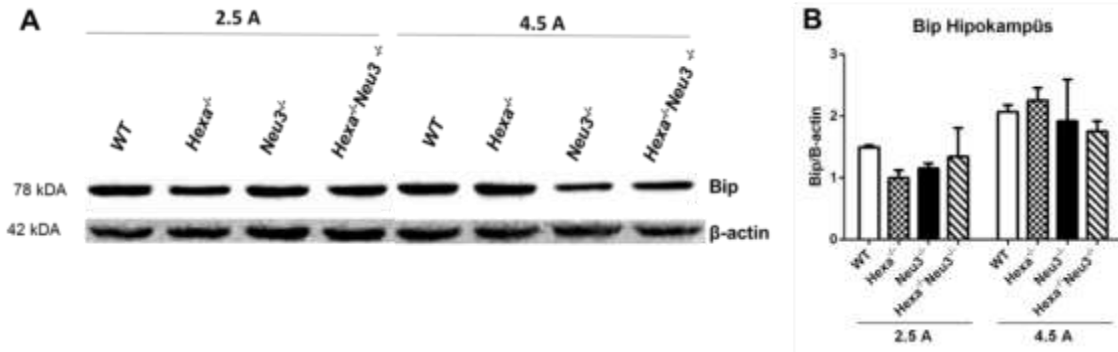


**Şekil 24.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **beyincik** dokusunda **Bip** antikoru için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorumun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorumun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

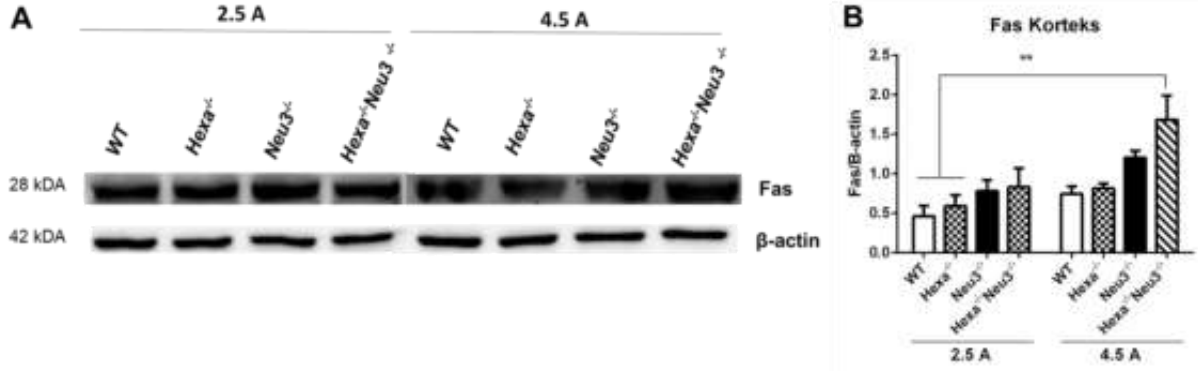




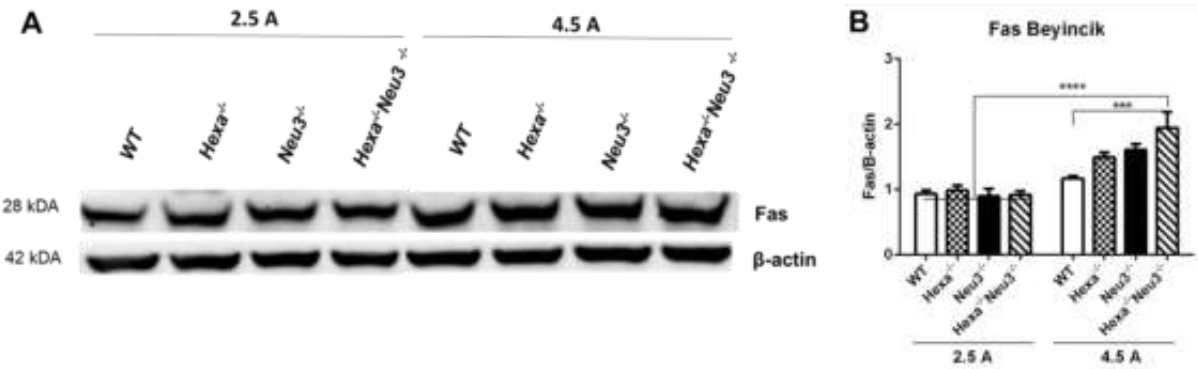
**Şekil 25.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda **Bip** antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



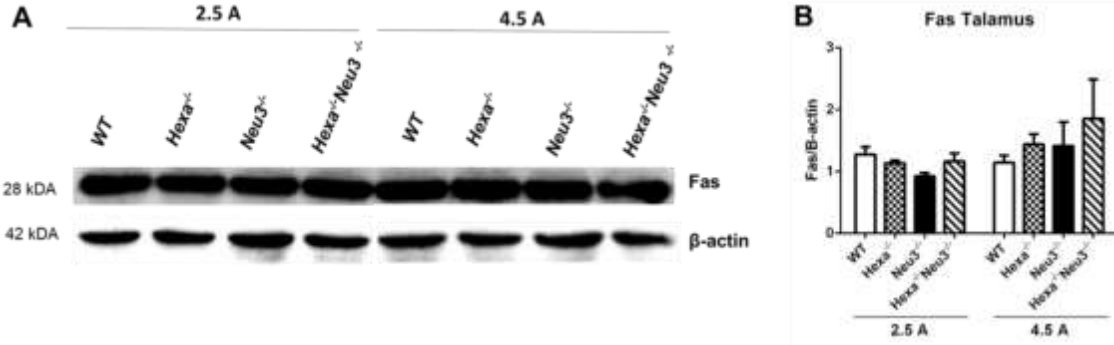
**Şekil 26.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda **Bip** antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Bip antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



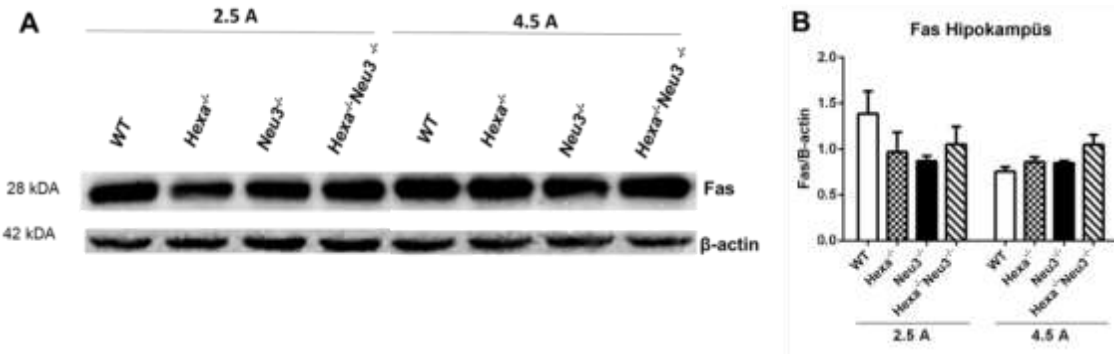
**Şekil 27.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **korteks** dokusunda **Fas** antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



**Şekil 28.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **beyincik** dokusunda **Fas** antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

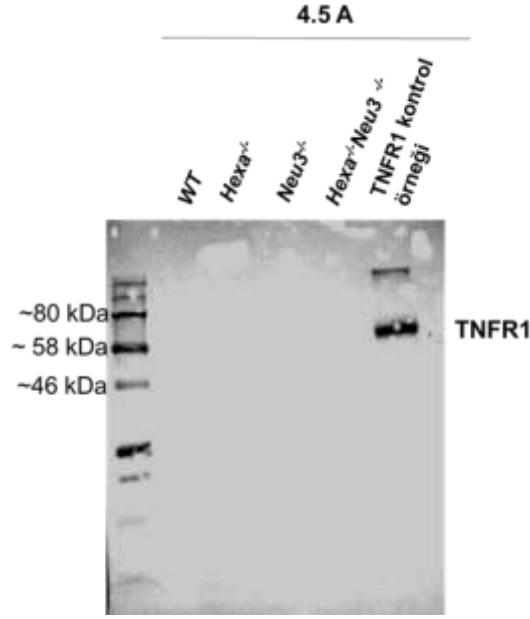


**Şekil 29.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda **Fas** antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



**Şekil 30.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda **Fas** antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Fas antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

Yapılan analizler sonucunda apoptoz belirteçlerinden biri olan Bip miktarında önemli bir değişim gözlemlenmemiştir (Şekil 23-26). 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin korteks bölgesinde apoptoz belirteci olan Fas, 2.5 aylık *WT* ve *Hexa*<sup>-/-</sup> faresine oranla önemli düzeyde artış göstermiştir (Şekil 27). Ayrıca 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin beyincik bölgesinde Fas protein seviyesi, 2.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> ve 4.5 aylık *WT* faresine oranla önemli düzeyde artış göstermiştir (Şekil 28). Bu durum özellikle beyincik ve korteks bölgelerinde *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerde yaşa bağlı olarak artan apoptoz varlığının bir göstergesidir.



**Şekil 31.** 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik dokusunda TNFR1 antikoru için Western Blot görüntüsü

TNFR1 bir başka apoptoz belirteçidir. Yapılan tüm optimizasyon denemelerinde farklı beyin bölgesinde TNFR1 miktarı tespit edilememiştir. Antikoron çalışıp çalışmadığını kontrol etmek için firmadan kontrol proteini istenmiştir. Kontrol proteininde TNFR1 gözlemlenmesine rağmen 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fare beyincik dokusundan izole edilen proteinde (20 µg) herhangi bir bağlanma gözlemlenmemiştir. Protein miktarı 20 µg, 40 µg, 60 µg, 120 µg, 240 µg 320 µg olarak denemeler yapılmış fakat hiç birinde bağlanma gözlemlenmemiştir. (Şekil 31).

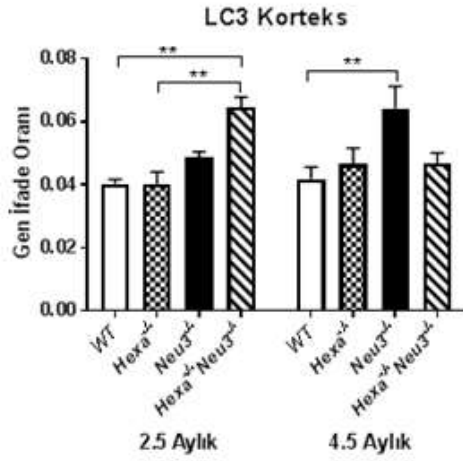
#### 4.4. OTOFAJİ ANALİZLERİ

Projemizin bu bölümünde amacımız *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin farklı beyin bölgelerini (korteks, beyincik, hipokampus ve talamus) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> fareleri ile karşılaştırılarak otofaji mekanizmasının etkilenip etkilenmediği yada bir başka deyimle Otofajik Flux'taki olası değişimi araştırmaktır. Bu amaçla 4 farklı genotipte 2.5 ve 4.5 aylık fare doku ve hücreleri ile 4 farklı deney seti (RT-PCR, Western Blot, otofagozom analizi ve IHC) planlanmıştır.

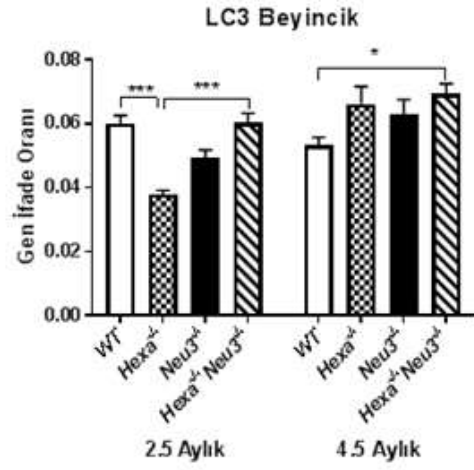
##### 4.4.1. MB Analizler (Gen İfade Analizleri)

RT-PCR ile 4 farklı genin (LC3, Beclin, p62 ve Lamp2) ifade düzeyi 4 farklı beyin bölgesinde çalışılmıştır. Sonuçları aşağıda sunulmuştur.

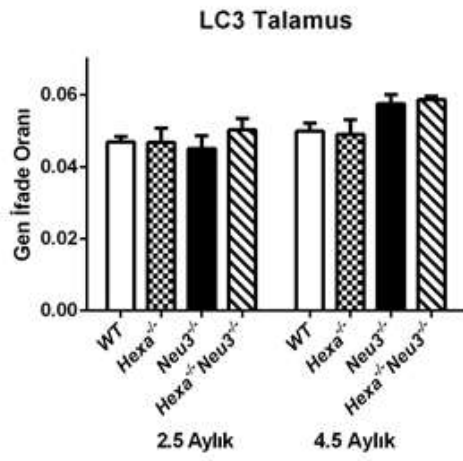
A.



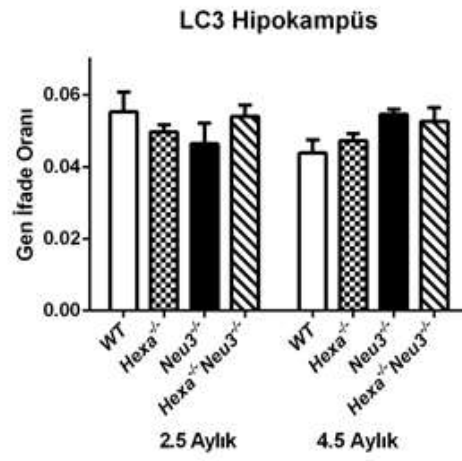
B.



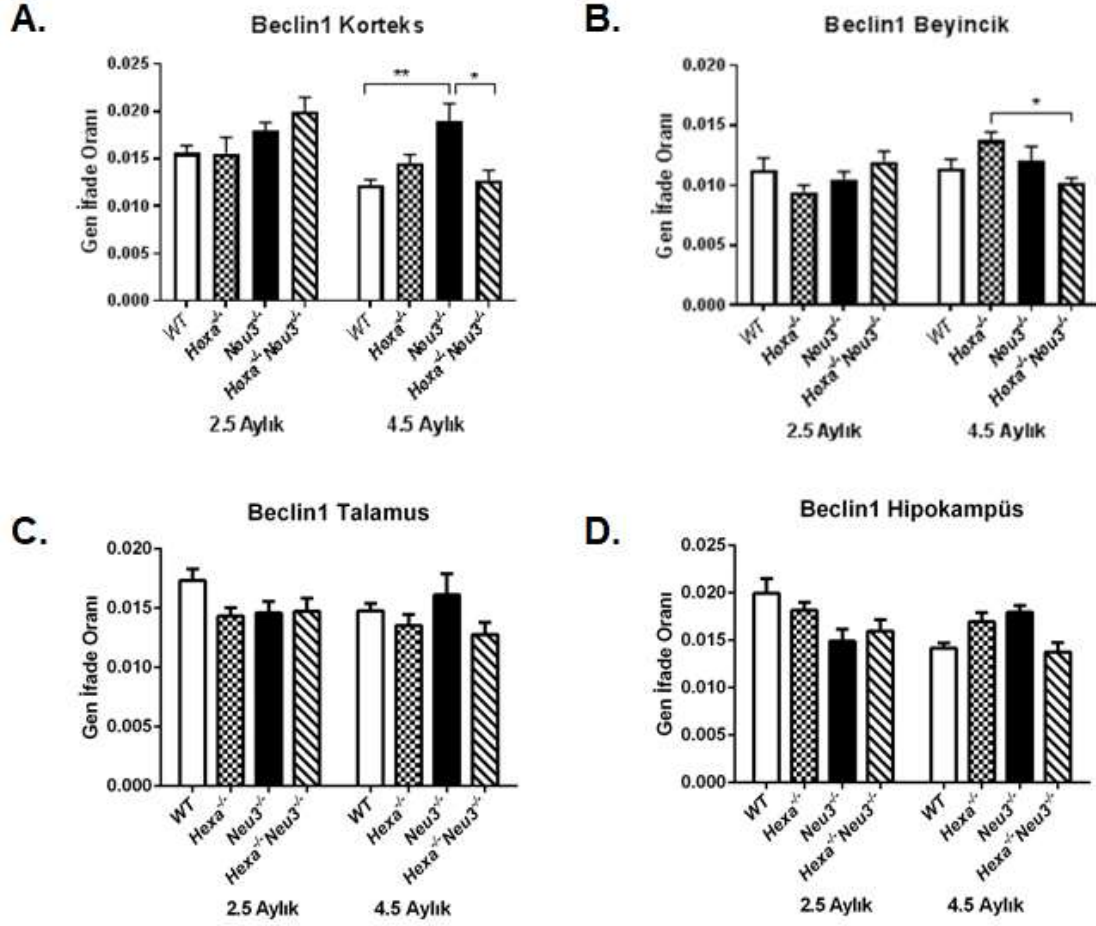
C.



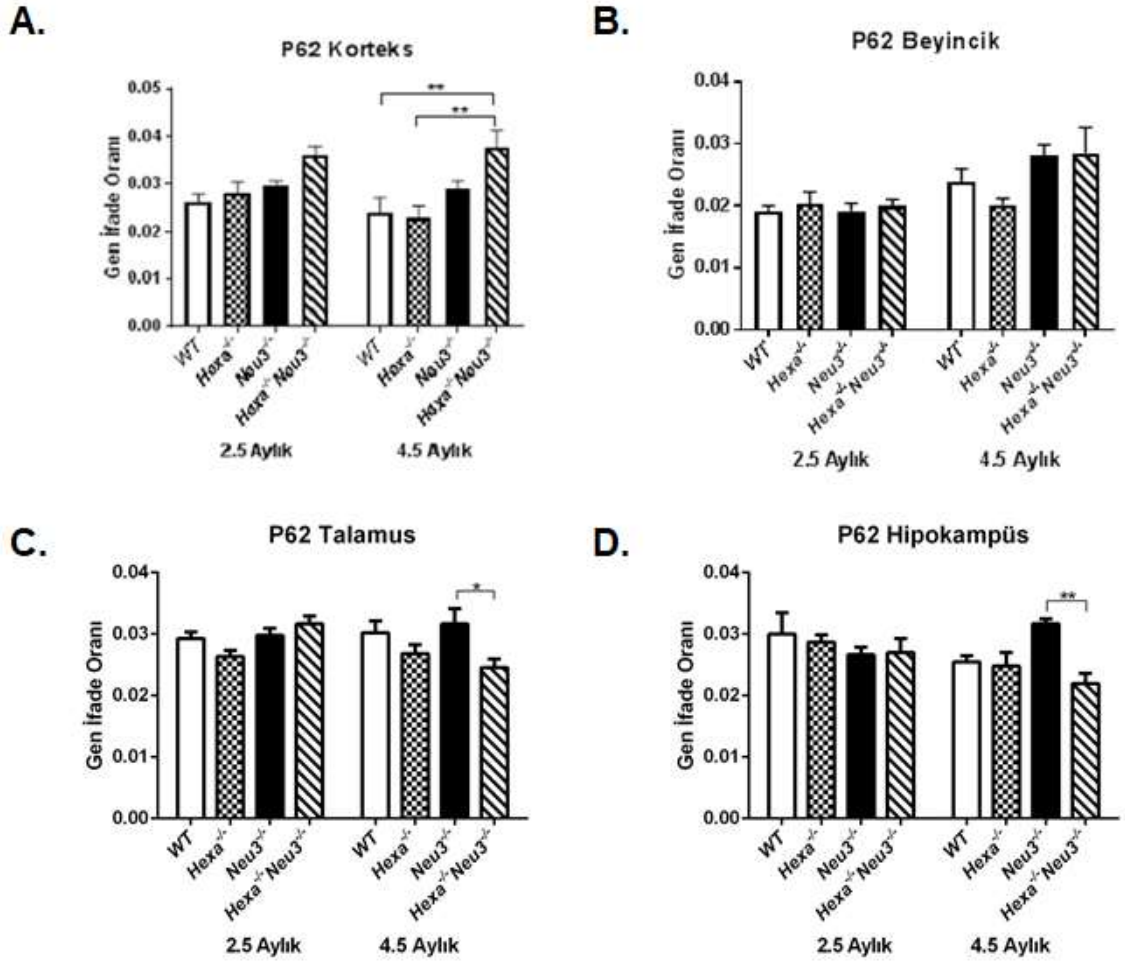
D.



**Şekil 32.** 2.5 ve 4.5 aylık WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup>, Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında LC3 gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01 \*\*\*p<0.001)

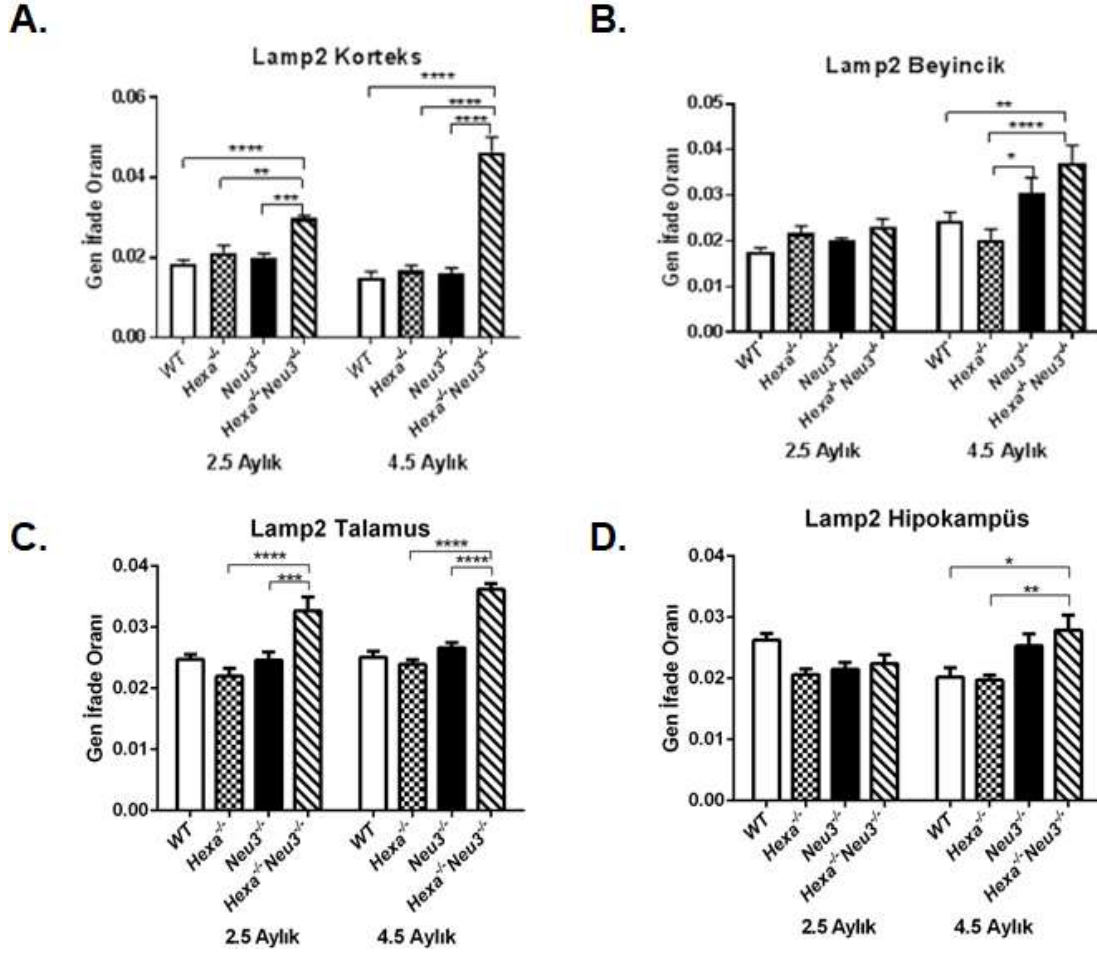


**Şekil 33.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında **Beclin1** gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01)



**Şekil 34.** 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampüs dokularında **p62** gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01)





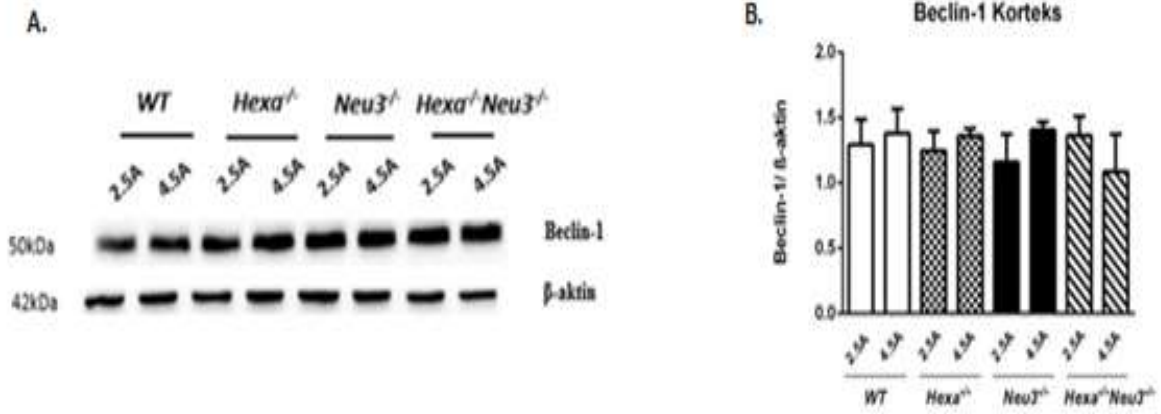
**Şekil 35.** 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde (A) korteks, (B) beyincik, (C) talamus ve (D) hipokampus dokularında **Lamp2** gen ifade oranı (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001)

Otofaji belirteçleri için yapılan gen ifade düzeyi analizlerinde, 2.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin korteks bölgesinde WT ve *Hexa*<sup>-/-</sup> faresiyle karşılaştırıldığında artan **LC3** ekspresyonu gözlenmiştir ayrıca 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin beyincik bölgesinde de WT ile karşılaştırıldığında LC3 ekspresyonunda anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 32). Beclin1 gen ifade oranı 4.5 aylık *Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin korteks bölgesinde önemli miktarda artmıştır. Buna karşın korteks'te WT ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresi için herhangi bir farklılık görülmemiştir. *Neu3*<sup>-/-</sup> faresi için ek deneyler yapılarak Neu3 sialidazın otofaji regulasyonunda rolü araştırılabilir (Şekil 33). 2.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin korteks bölgesinde Beclin1 ifade düzeyi artmış olmasına bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. p62 gen ifade düzeyi ise 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin korteks bölgesinde WT ve *Hexa*<sup>-/-</sup> faresiyle karşılaştırıldığında anlamlı bir artış göstermiştir ancak diğer bölgelerde yaşa ve genotipe bağlı herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 34). Lizozomal bir belirteç olan Lamp2 gen ifade düzeyi *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinde çalışılan bütün

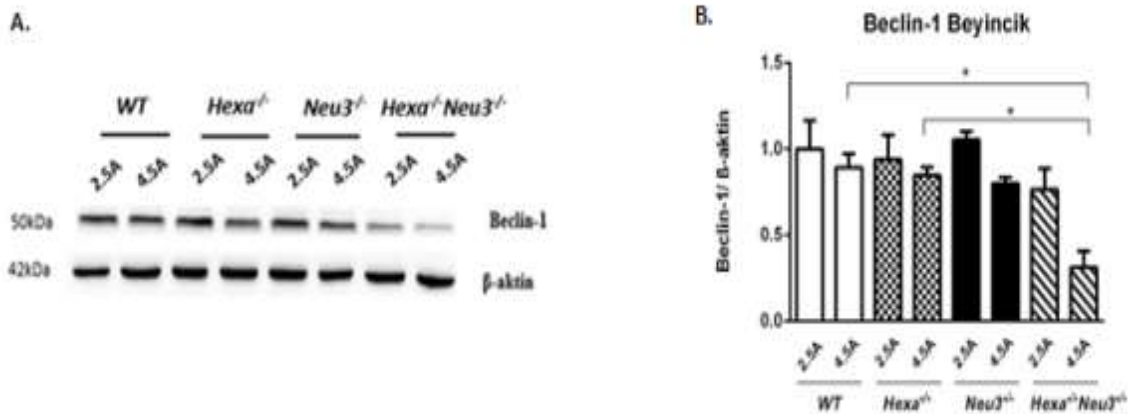
bölgelerde yaşa bağlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir (Şekil 35); bu *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> faresinin patolojisinde görülen artan lizozom birikimini ve anormalitesini desteklemektedir.

#### 4.4.2. Western Blot Analizleri

Otofaji ile 3 farklı genin ifadesi protein düzeyinde yine 2.5 ve 4.5 aylık farelere ait 4 farklı beyin bölgesinde çalışılmıştır.

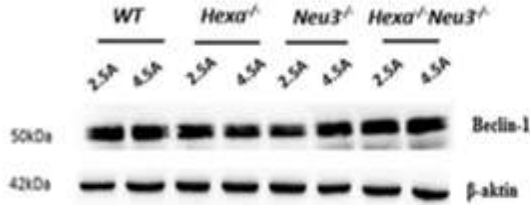


**Şekil 36.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **korteks** dokusunda **Beclin-1** antikor için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikor bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

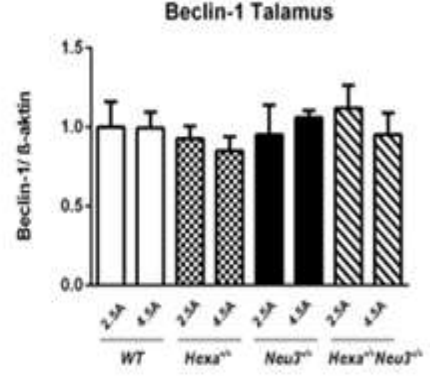


**Şekil 37.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **beyincik** dokusunda Beclin-1 antikor için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3,\*p<0.05)

A.

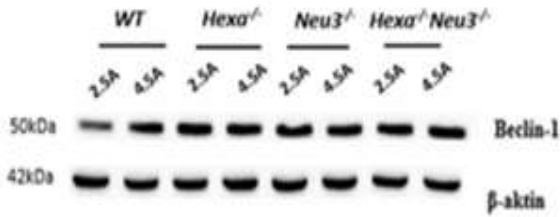


B.

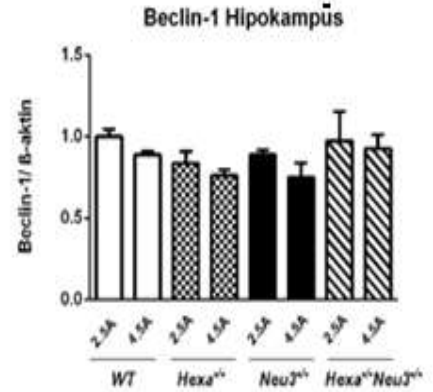


**Şekil 38.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda Beclin-1 antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

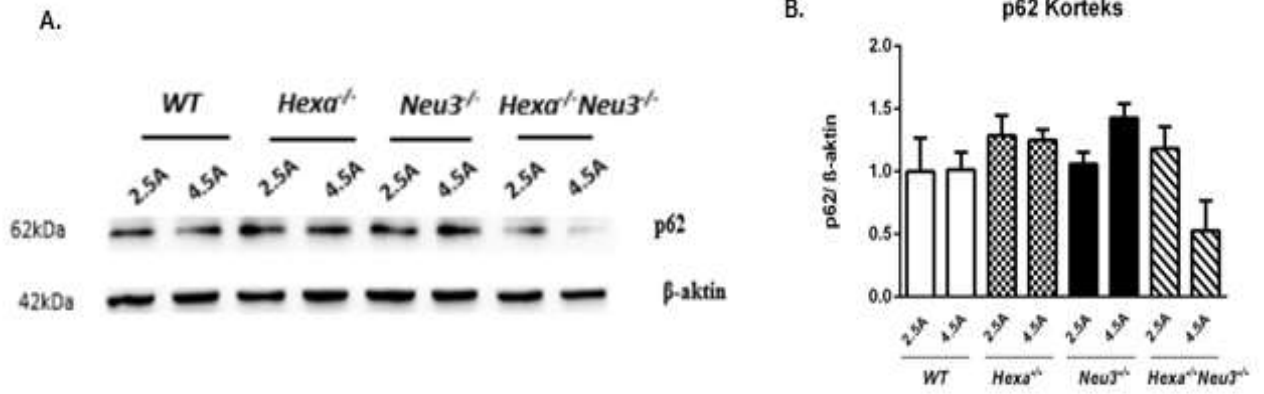
A.



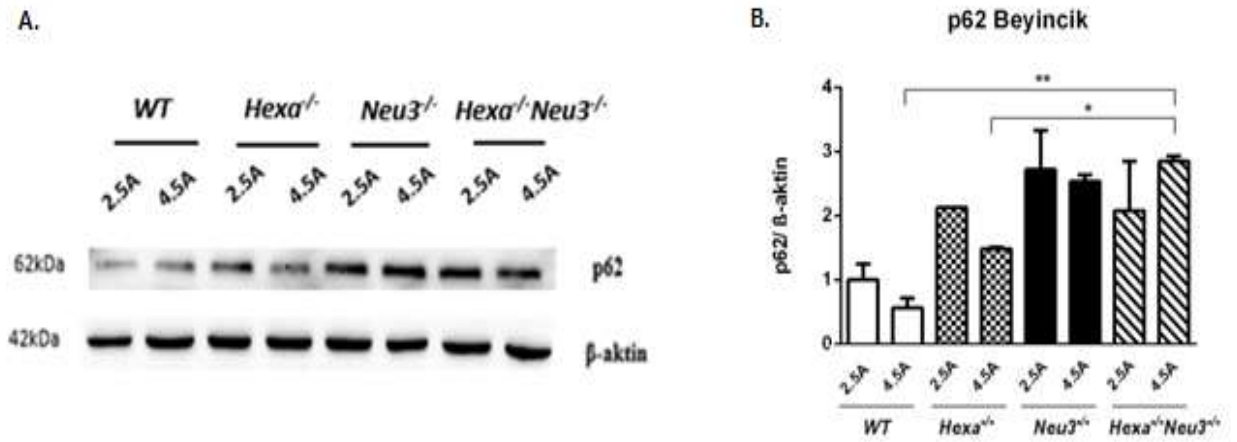
B.



**Şekil 39.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda **Beclin-1** antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) Beclin-1 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

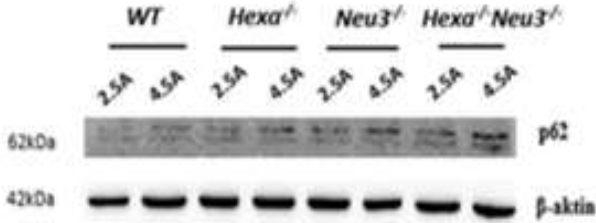


**Şekil 40.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **korteks** dokusunda **p62** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

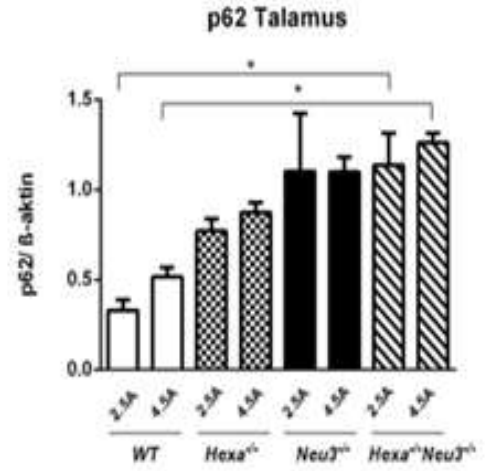


**Şekil 41.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **beyincik** dokusunda **p62** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

A.

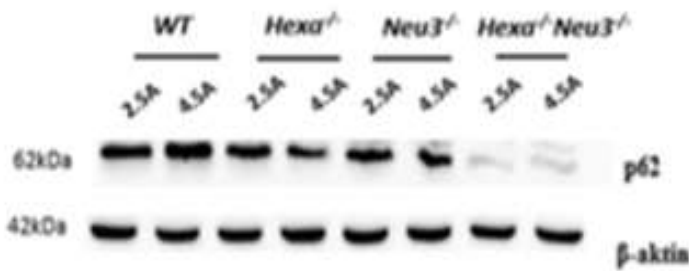


B.

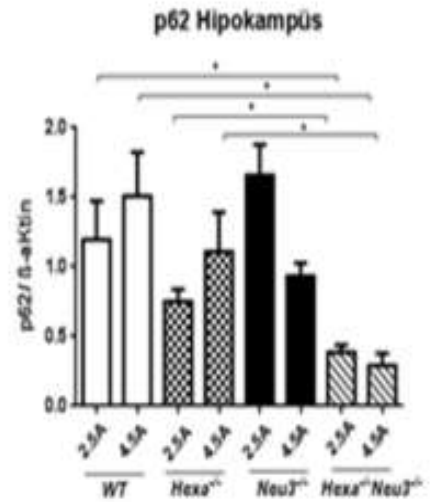


**Şekil 42.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda **p62** antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0,05).

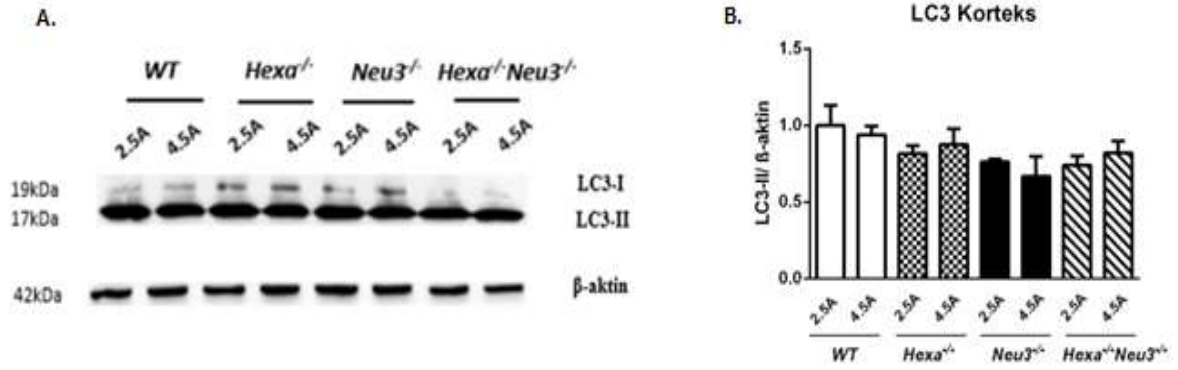
A.



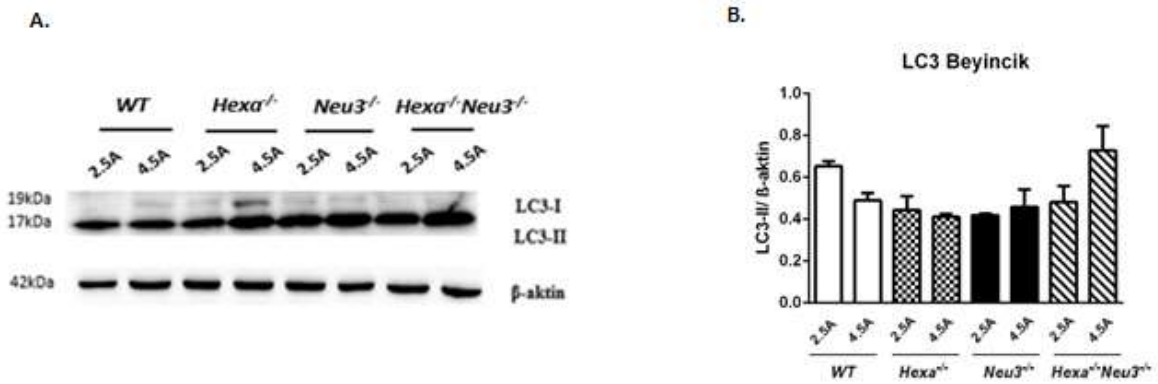
B.



**Şekil 43.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda **p62** antikoruna için Western Blot görüntüsü.  $\beta$ -aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) p62 antikorunun bant yoğunluk oranının  $\beta$ -aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3, \*p<0,05 \*\*p<0,01).



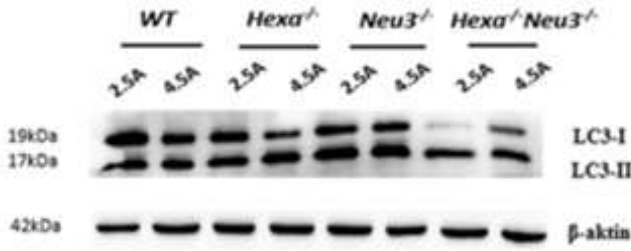
**Şekil 44.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **korteks** dokusunda **LC3** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).



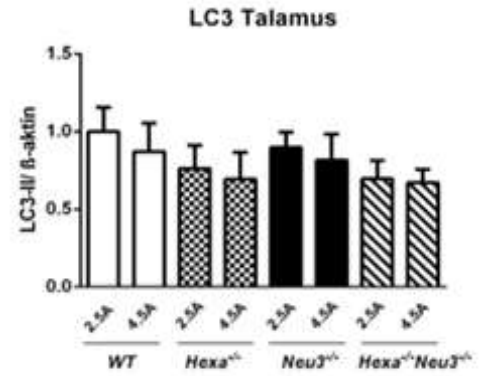
**Şekil 45.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **beyincik** dokusunda **LC3** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).



A.

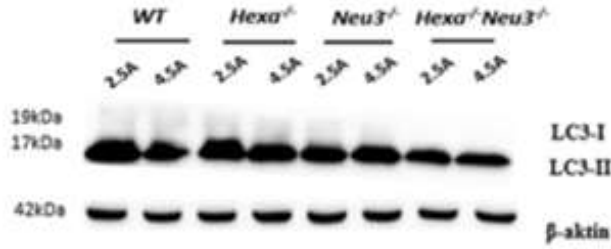


B.

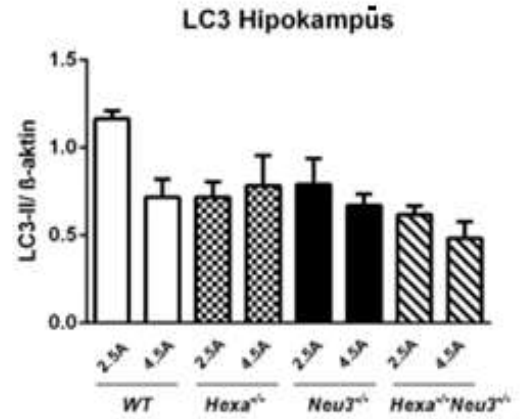


**Şekil 46.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **talamus** dokusunda **LC3** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

A.



B.



**Şekil 47.** (A) 2.5 ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde **hipokampus** dokusunda **LC3** antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) LC3-II antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikoruna bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3).

**Korteks** bölgesinde, otofaji belirteçleri olan Beclin-1 (otofagor oluşumu), LC3-II (otofagazom oluşumu) ve p62 (otofagolizozom parçalanması) protein ifade düzeylerinde genotip ve yaşa bağlı herhangi bir fark gözlenmemiştir (Şekil 36, 40, 44). **Beyincik** bölgesinde ise Beclin-1 ifade düzeyi 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerde *WT* ve *Hexa*<sup>-/-</sup> ile karşılaştırıldığında önemli miktarda azalmaktadır (Şekil 37). LC3-II ise yine beyincikte 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farede *Hexa*<sup>-/-</sup> ile

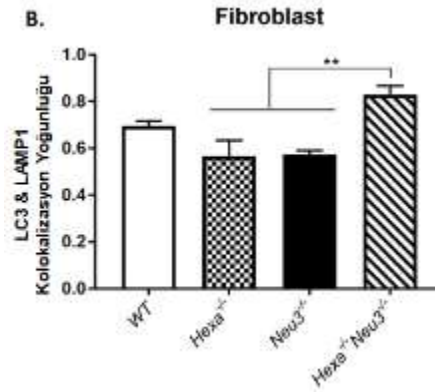
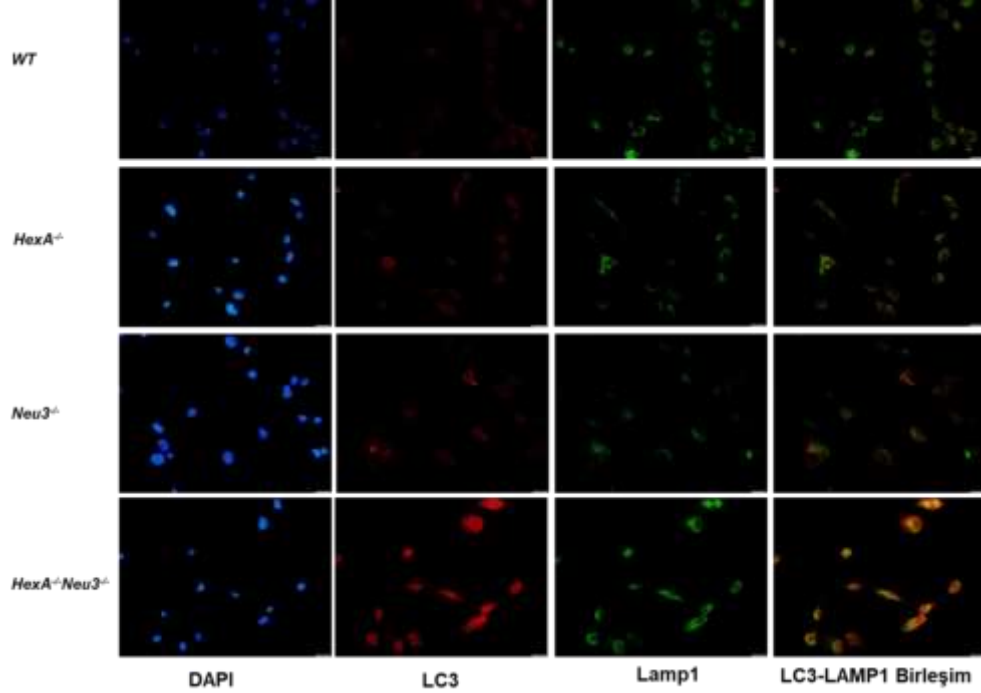


karşılaştırıldığında artmış ancak anlamlı bulunmamıştır (Şekil 45). Beyincikteki p62 protein ifadesi 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresinde *WT* ve *Hexa-/-* farelere göre belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 41). Bu durum 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresinin beyincik bölgesinde otofajinin tamamlanamadığının bir göstergesidir. **Talamus** bölgesinde, Beclin 1 belirteçi için herhangi bir fark gözlenmezken (Şekil 38), 2.5 ve 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* farelerin bu bölgesinde LC3-I ve LC3-II bantlarında fark olduğu tesbit edilmiştir ve  $\beta$ -aktin ile oranlandığında bu fark istatistiksel önemde değildir (Şekil 46), p62 protein ifadesi 2.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresinde 2.5 aylık *WT* faresine göre belirgin bir artış göstermiştir (Şekil 42). Bununla beraber talamus bölgesinde 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresi, 4.5 aylık *WT* ile karşılaştırıldığında p62 protein ifadesinde belirgin düzeyde artış göstermektedir (Şekil 42). Bu durum her iki yaş grubunda *Hexa-/-Neu3-/-* faresinin talamus bölgesinde otofajinin tamamlanammasında bir problem olduğunun bir göstergesidir. **Hipokampus** bölgesinde, Beclin-1 ve LC3-II belirteçleri için herhangi bir fark gözlenemezken, p62 protein ifadesi 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresi, 4.5 aylık *WT* ve 4.5 aylık *Hexa-/-* fare grupları ile karşılaştırıldığında belirgin düzeyde azalış göstermiştir (Şekil 39, 43, 47).

Yapılan Western Blot analizleri sonucunda, Beclin-1, LC3-II ve p62 protein seviyelerinde farklı beyin bölgeleri için yaşa ve genotipe bağlı belirgin değişimler gözlemlenmesine rağmen, otofajik akışı daha iyi anlayabilmek için bu farelerden elde edilen fibroblast hücre hatları kullanılarak ileride detaylı analizleri yapılabilir. Öyleki otofajiyi indükleyen çeşitli kimyasallar (rapamisin, resveratrol) kullanılarak, hücreler muamele edilip genotipe bağlı farklılık olup olmadığı yine in vitro deneylerle gözlemlenebilir. Benzer şekilde bu farelerde in vivo olarak ör. rapamisin uygulaması sonrası ilaca yanıt olarak otofajik yolağın tamamlanması bir başka projede araştırılabilir.

#### 4.4.3. Otofagozom Analizi

A.

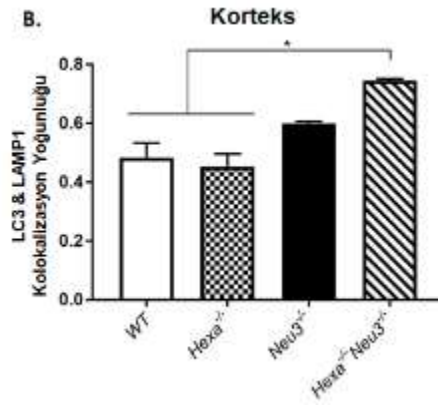
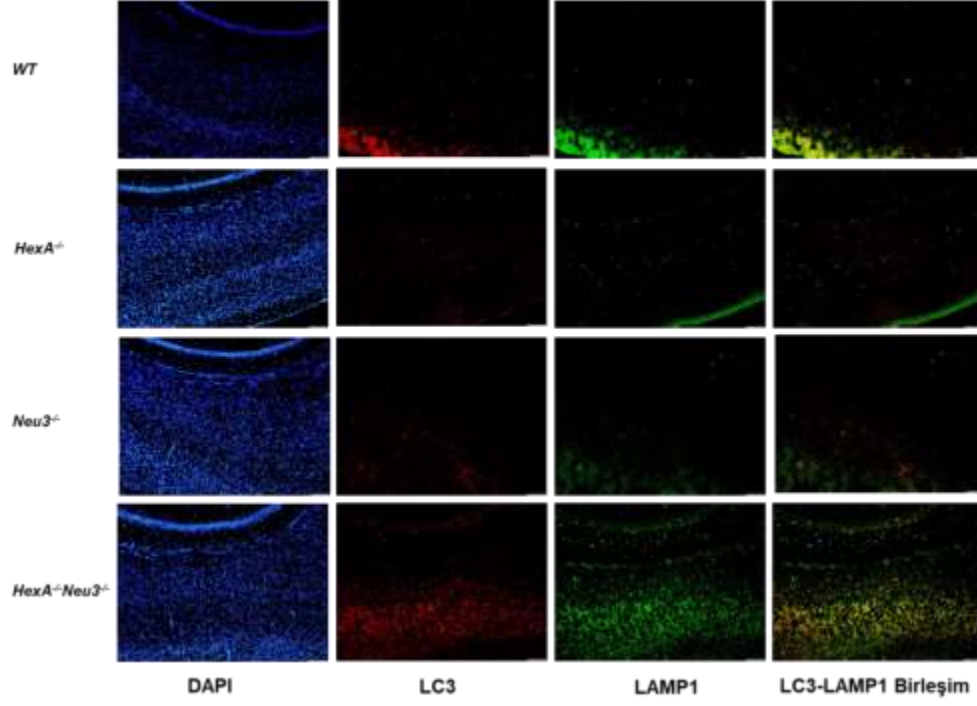


**Şekil 48.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin birincil fibroblast hücrelerinde LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunositokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.

LC3 ve LAMP1 antikorları ile yapılan immünositokimyasal çalışmamız ve kolokalizasyon görüntüleri *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelere ait fibroblast hücrelerinde *WT* ve *Hexa*<sup>-/-</sup> ile *Neu3*<sup>-/-</sup> fibroblastları ile karşılaştırıldığında önemli oranda artan otofagozom oluşumunu varlığını göstermiştir (Şekil 48).

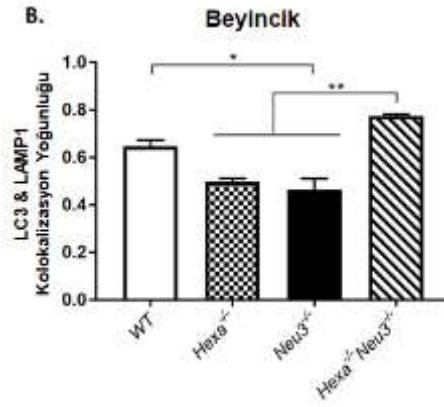
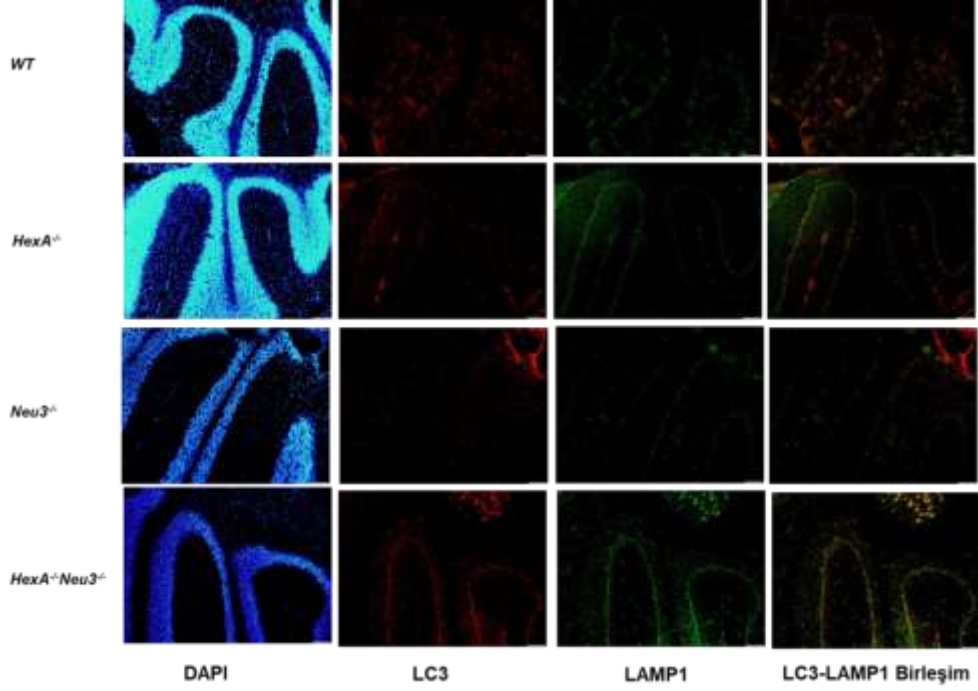
#### 4.4.4. IHC Analizleri

##### A. Korteks Bölgesi



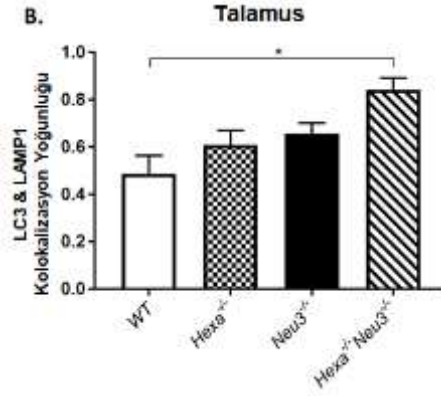
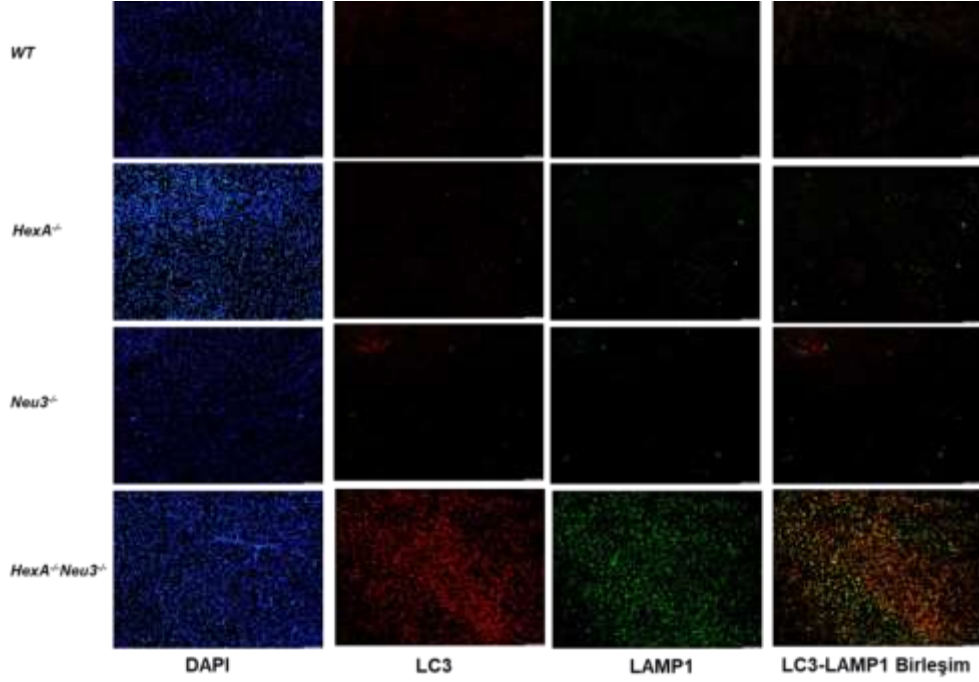
**Şekil 49.** (A) 4.5 aylık *WT*, *HexA*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *HexA*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.

## B. Beyincik Bölgesi



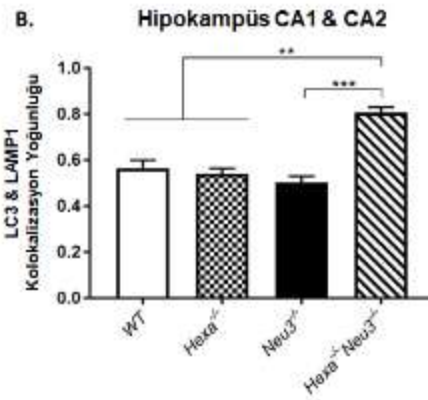
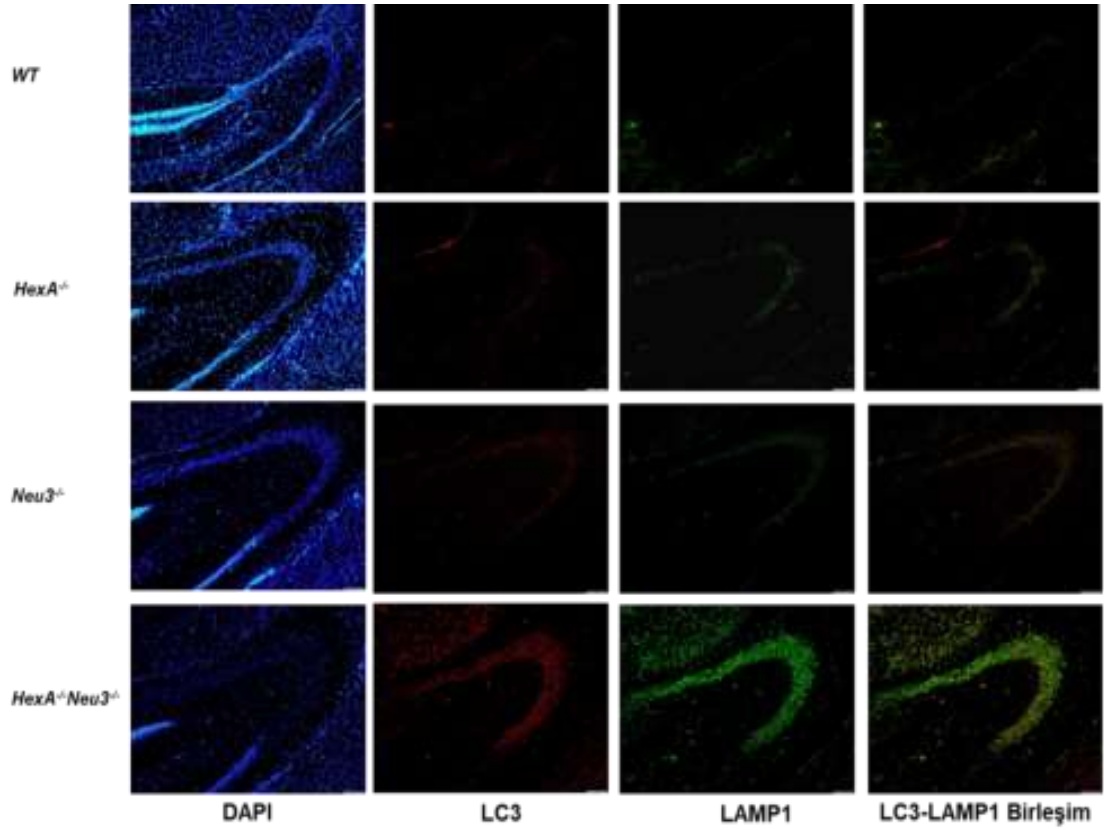
**Şekil 50.** (A) 4.5 aylık *WT*, *HexA*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *HexA*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde beyincik bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.

### C. Talamus Bölgesi



**Şekil 51.** (A) 4.5 aylık *WT*, *HexA*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *HexA*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde talamus bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.

#### D. Hipokampus Bölgesi I: CA1 ve CA2

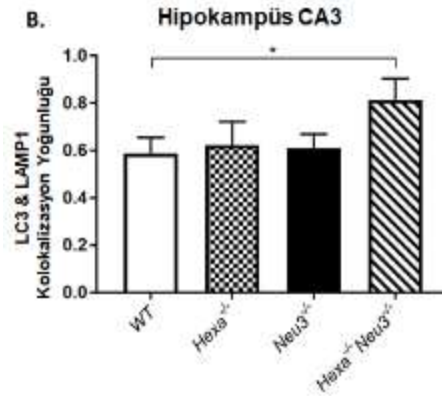
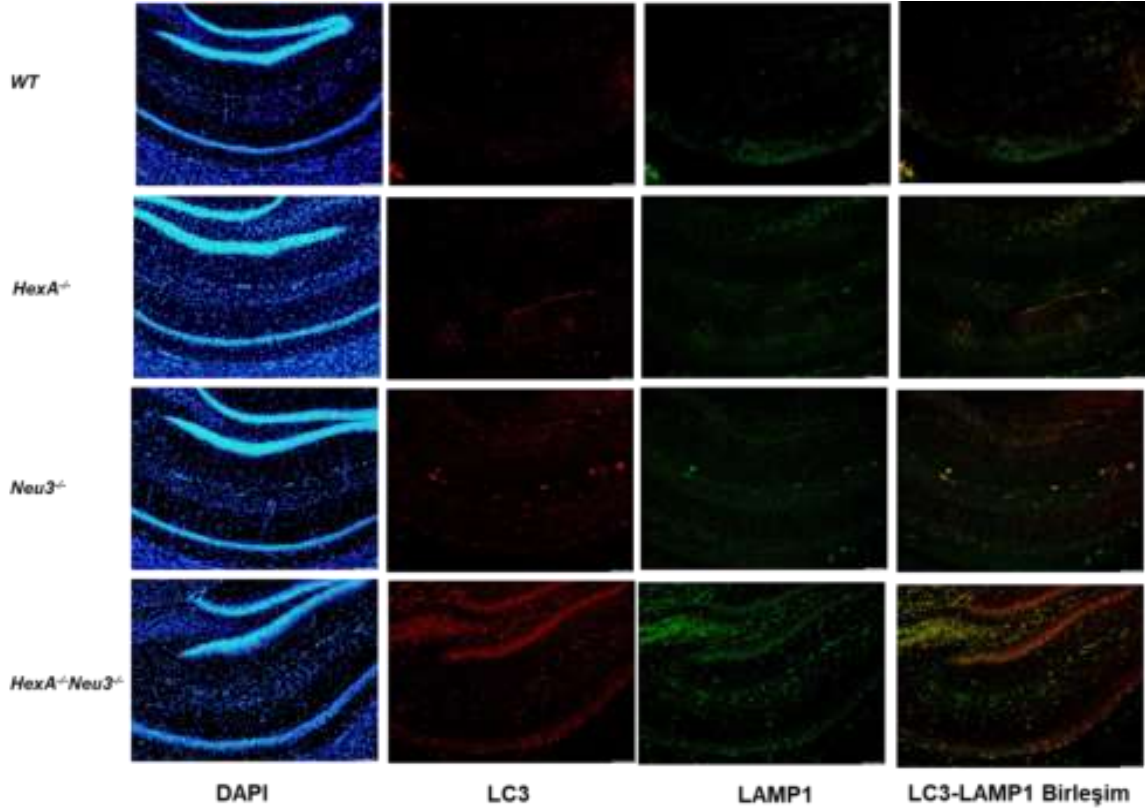


**Şekil 52.** (A) 4.5 aylık *WT*, *HexA*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *HexA*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus **CA1** ve **CA2** bölgelerinde LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3,



yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.

### E. Hipokampus Bölgesi II: CA3



**Şekil 53.** (A) 4.5 aylık *WT*, *HexA*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *HexA*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde hipokampus **CA3** bölgesinin LC3 ve LAMP1 proteinlerinin immunohistokimya ile analizi. (Kırmızı ışımalar LC3, yeşil ışımalar LAMP1 proteinlerini göstermektedir. Fotoğraflar 10X büyütmede çekilmiştir.) (B) LC3 ve LAMP1 proteinlerinin kolokalizasyon yoğunluğunun gösterimi.



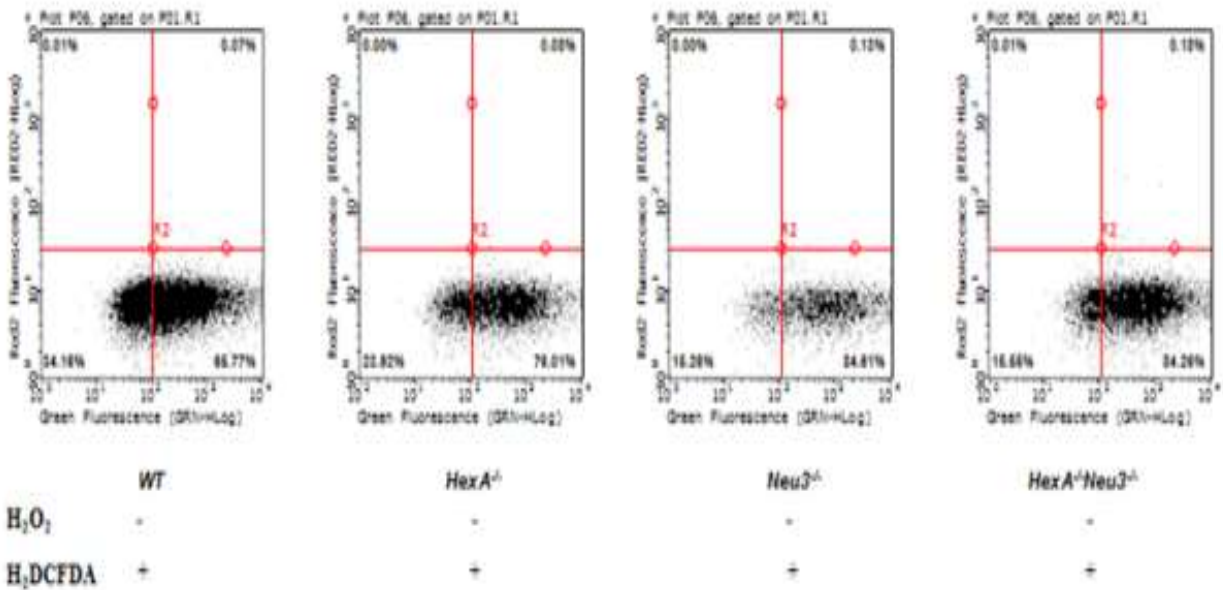
Erken başlangıçlı Tay-Sachs fare modelinde otofajik akışta bozulma ve otofajik ürünlerde ikincil birikim olup olmadığını anlamak için LC3 ve Lamp1 proteinleri için immunositokimyasal ve immunohistokimyasal analizler yapılmıştır. *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerden elde edilen fibroblast hücrelerinde LC3 ve Lamp1 proteinlerinin kolokalizasyon seviyesinde *WT* ve/veya *Hexa*<sup>-/-</sup> fareleriyle karşılaştırıldığında anlamlı artış gözlenmiştir (Şekil 48). Elde edilen veriler *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde korteks, beyincik, talamus, hipokampus bölgelerinde ve otofagozom belirteci olan LC3 ve lizozomal belirteç olan Lamp1 kolokalizasyonu otofagolizozom yapısını göstermektedir (Şekil 49-53). Bu durum *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde daha önce gösterilmiş olan artan lizozom sayısı (Seyrantepe ve ark, 2018) ve otofagolizozom birikimi ile ilişkilendirilebilir. Otofajinin tamamlanıp tamamlanmadığını daha iyi anlamak için ör. p62 proteinin immunohistokimyasal analizi yapılabilir.

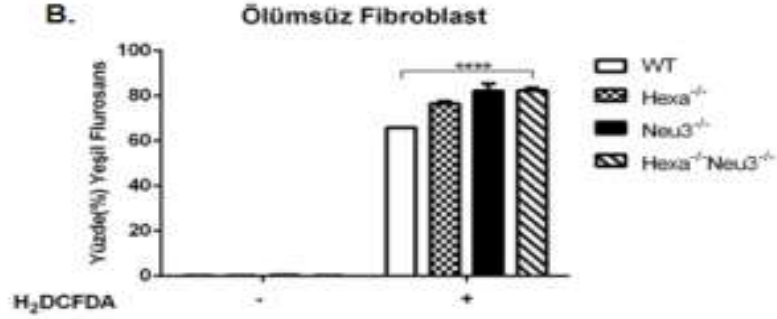
#### 4.5. REAKTİF OKSİDATİF TÜR (ROS) Analizleri

##### 4.5.1. Hücre İçi ROS Seviyesinin Belirlenmesi

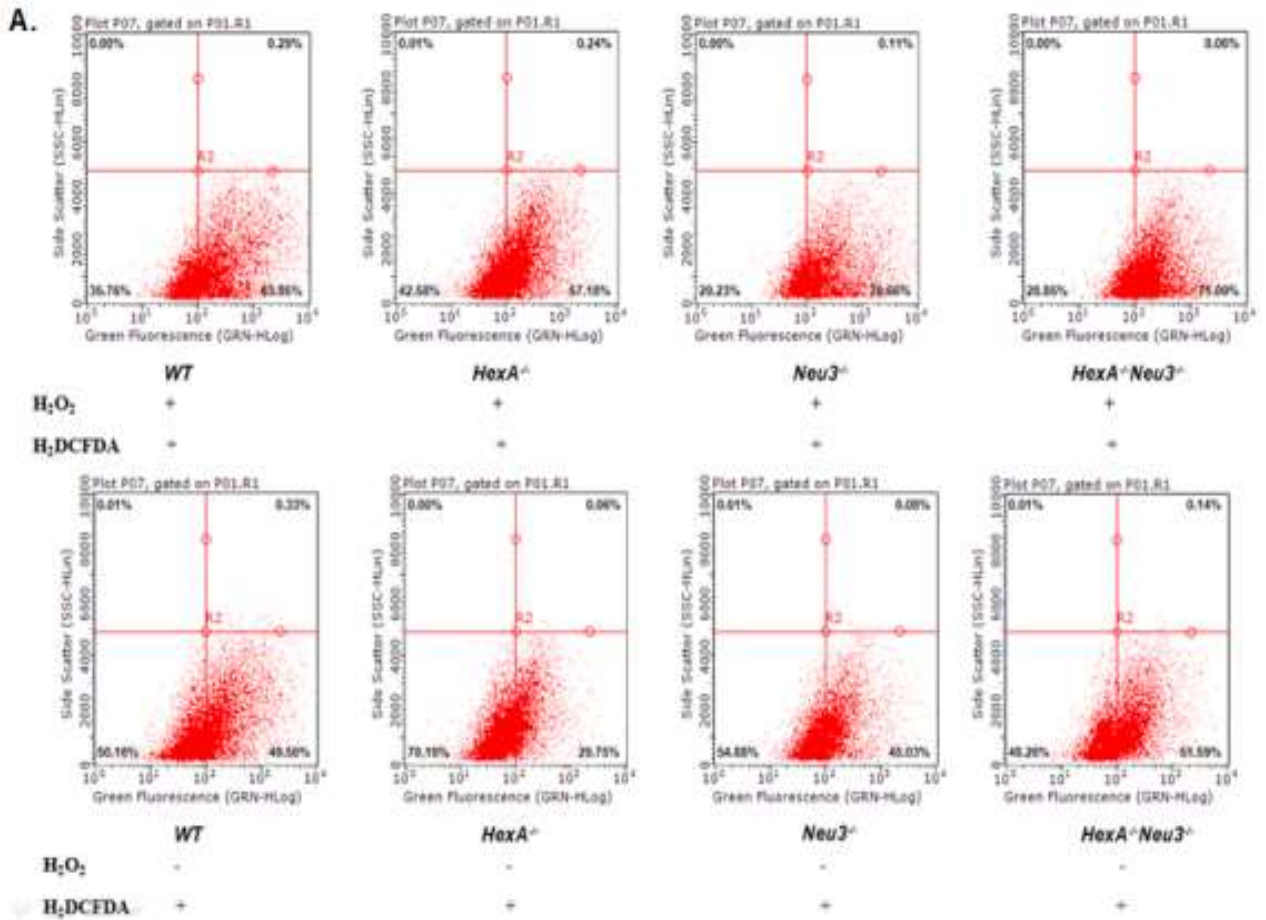
*WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz ve birincil fibroblastlarındaki ROS seviyesi; H<sub>2</sub>DCFDA'nın hücre içi ROS varlığında yüksek florasana sahip DCF'e yükseltgenme seviyesi akış sitometrisi kullanılarak ölçülmüştür.

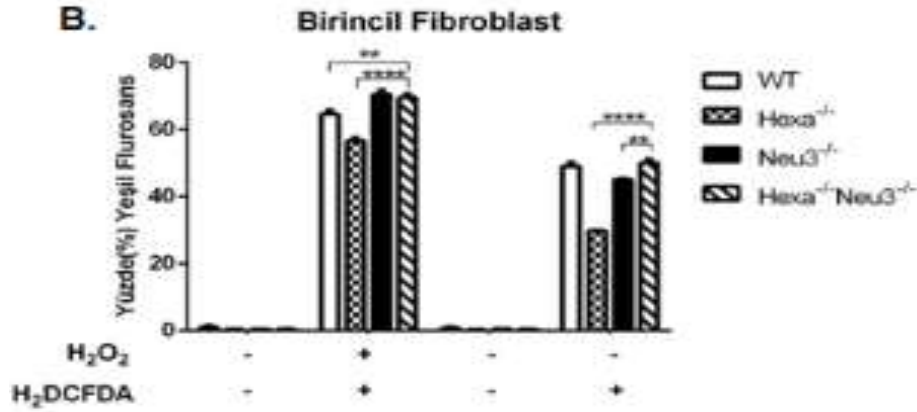
A.





**Şekil 54.** (A) Ölümsüz Fibroblastların hücre içi ROS seviyesinin belirlenmesi için H<sub>2</sub>DCFDA ile FACS analizi. (B) Negatif kontrol ve deney grubu hücrelerindeki yeşil flurosans ışımaya yüzdesi(n=3, \*\*\*\*p<0.0001)

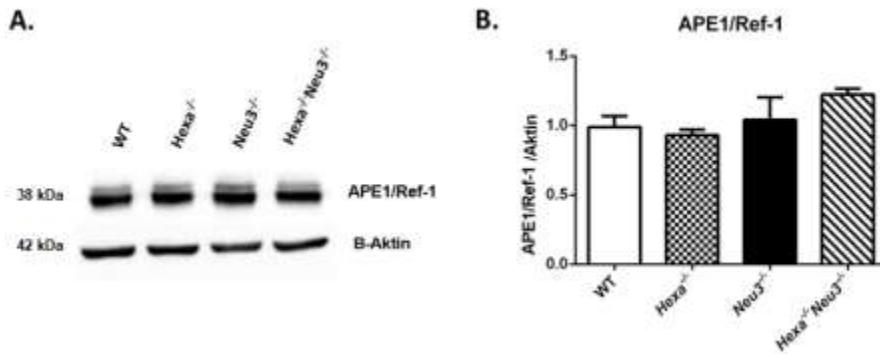




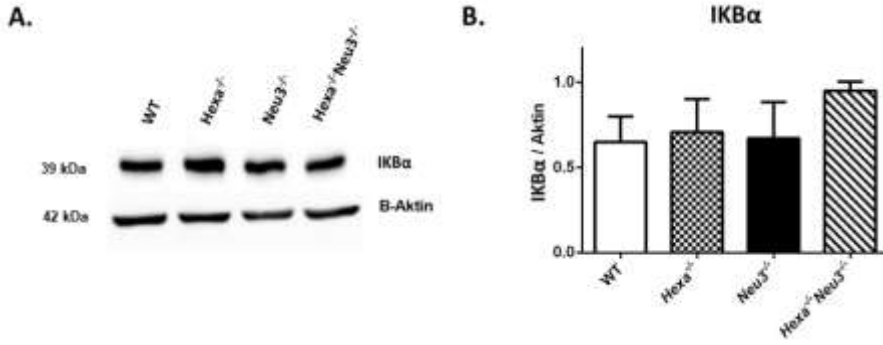
**Şekil 55.** (A) Birincil Fibroblastların hücre içi ROS seviyesinin belirlenmesi için H<sub>2</sub>DCFDA ile FACS analizi. (B) Negatif kontrol, pozitif kontrol ve deney grubu hücrelerindeki yeşil floresan ışımaya yüzdesi (n=3, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001)

Verilerimiz *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblastlarında *WT* fibroblastlarındakine göre anlamlı seviyede artmış ROS miktarı gözlenmiştir (Şekil 54). Benzer şekilde birincil fibroblastlarda ise hem pozitif kontrol hem de deney grubunda *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fibroblast hücrelerinde *Hexa*<sup>-/-</sup> ile karşılaştırıldığında anlamlı seviyede ROS artışı gösterilmiştir ve sonuçlarımız *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerde anormal lizizomal birikim sonucu hücre içi dengenin bozulduğunun bir başka göstergesidir (Şekil 55).

#### 4.5.2. Western Blot Analizi



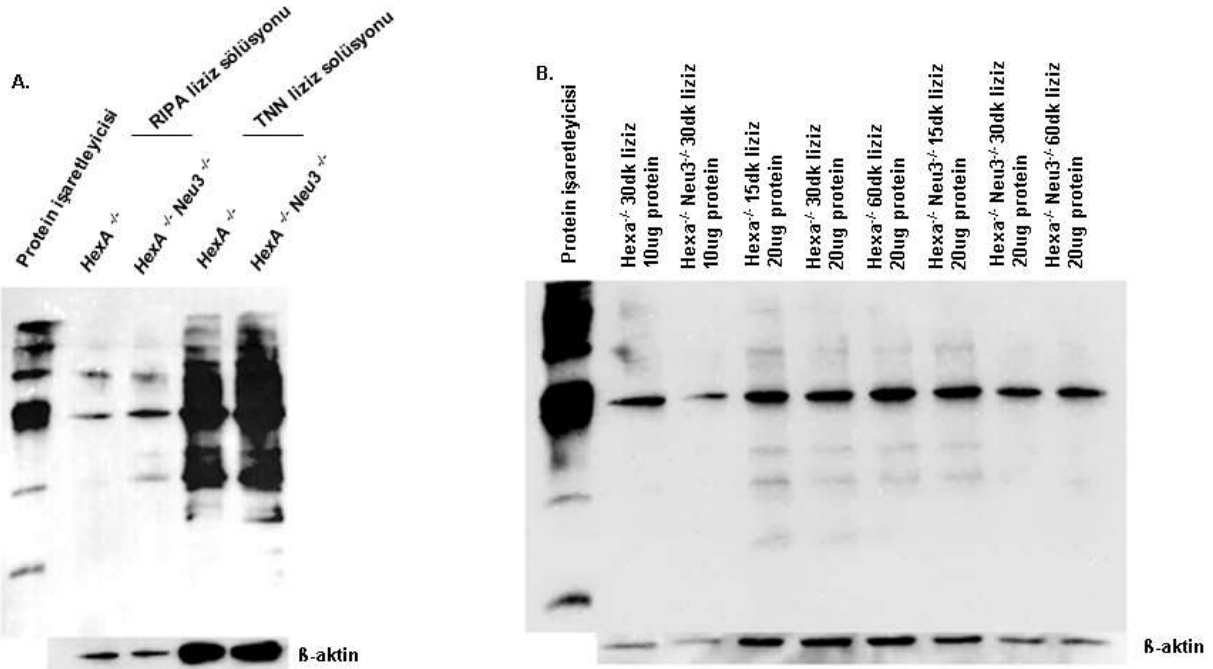
**Şekil 56.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblastlarında APE1 antikoruna için Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) APE1 antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)



**Şekil 57.** (A) WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup>, Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblastlarında IKKα antikoruna karşı Western Blot görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (B) IKKα antikorunun bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3)

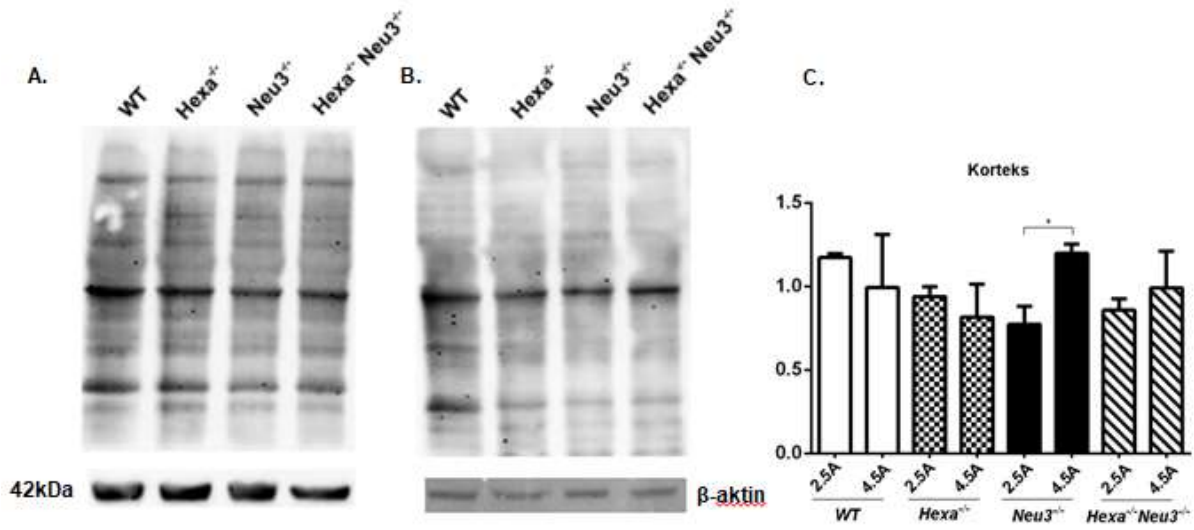
Oksidatif strese karşı verilen hücresel cevabı düzenleyen proteinlerden biri olan APE1/Ref-1 ve NFκB proteininin inhibitörü olan IKKα proteinlerinin ifade düzeyi Western Blot ile analiz edilmiştir. Ancak iki protein seviyelerinde genotipe bağlı W Blot yöntemi ile herhangi bir anlamlı fark gösterilememiştir (Şekil 56,57).

#### 4.5.3. Protein Karbonilasyon Analizi

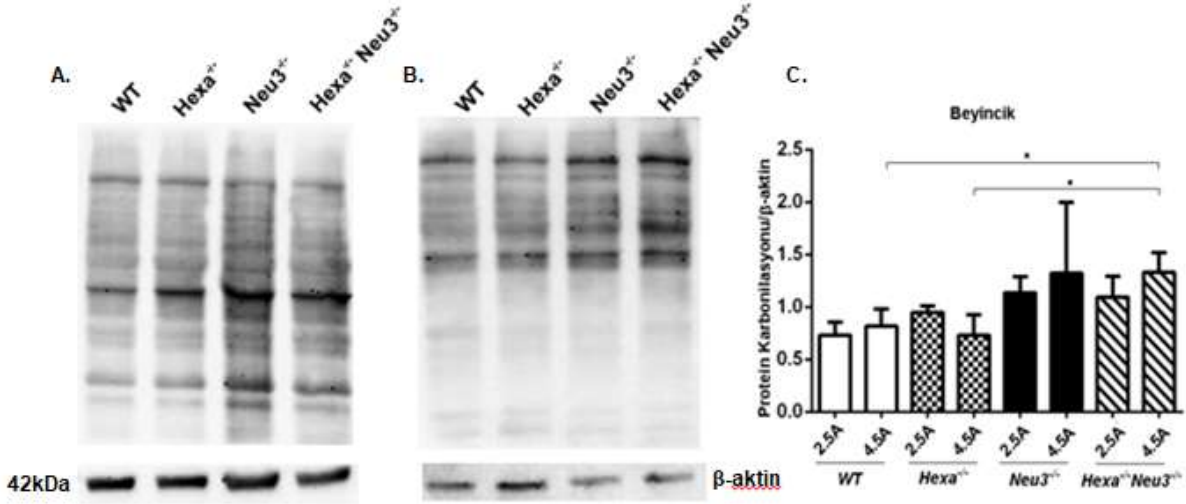


**Şekil 58.** Hexa<sup>-/-</sup> ve Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinden oluşturulmuş ölümsüz fibroblast hatlarından (A) iki farklı (RIPA ve TNN) liziz solüsyonu ile liziz edilmiş ve 10 µg şeklinde yüklenmiş proteinlerin karbonil miktar analizi. (B) farklı zaman dilimlerinde (15 dakika, 30 dakika, 60 dakika) liziz edilmiş ve farklı miktarlarda (10 µg ve 20 µg) yüklenmiş proteinlerin karbonil miktar analizi.

Protein karbonilasyon analizi sadece *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinden elde edilen fibroblastlar ile yapılmıştır. İki farklı liziz tamponu, farklı zamanlarda protein liziz süreleri ve farklı miktarlarda yüklenmiş protein örnekleri gibi denemeler yapılarak metodun optimizasyonu gerçekleştirilmeye çalışılmış ancak *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelere ait fibroblastlar arasında herhangi bir fark tesbit edilememiştir (Şekil 58). Protein karbonilasyon analizi daha sonra 2.5 aylık ve 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> fare gruplarından alınmış korteks ve beyincik bölgelerinde, 1% β-merkaptolanol içeren RIPA tampon çözeltisi ile protein izolasyonu yapılmış ve görüntülenmiştir.



**Şekil 59.** (A) 2.5 aylık ve (B) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin **korteks** dokusunda protein karbonilasyonu görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (C) Karbonilli proteinlerin bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi (n=3; \*p<0,05).

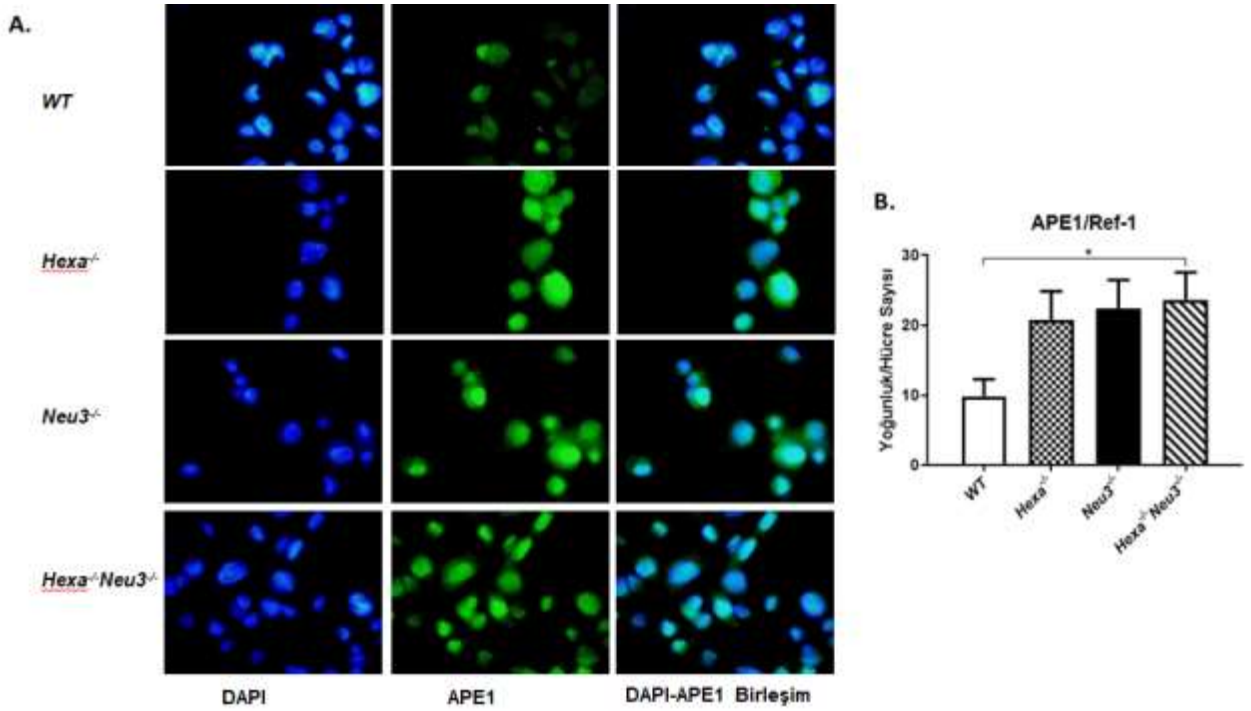


**Şekil 60.** (A) 2.5 aylık ve (B) 4.5 aylık *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerin **beyincik** dokusunda protein karbonilasyonu görüntüsü. β-aktin yükleme kontrolü olarak kullanıldı. (C) Karbonilli proteinlerin bant yoğunluk oranının β-aktin antikorunun bant yoğunluk oranına göre gösterimi. (n=3; \*p<0,05).

2.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farenin beyincik örnekleri için *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *WT* farelerin beyincik bölgelerine göre karbonillenmiş protein seviyelerinde değişiklikler gözlenmiştir (Şekil 60A). Proteinlerin oksidasyon analizinde ise 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farenin beyincik bölgesinde bulunan protein karbonil seviyeleri, *Hexa*<sup>-/-</sup> ve *WT* farelerin beyincik bölgelerindeki protein karbonil miktarlarına göre belirgin bir artış göstermektedir (Şekil 60B). Protein karbonil seviyelerindeki değişiklikler 4.5 aylık *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farenin korteksi için değerlendirilmiştir, ancak beyincik bölgesi kadar değişiklik gözlenmemiştir. Korteks bölgesinde *Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinde görülen yaşa bağlı artış dışında genotiplere bağlı bir fark gözlenmemiştir (Şekil 59).



#### 4.5.4. Immunositofloresan Analizler



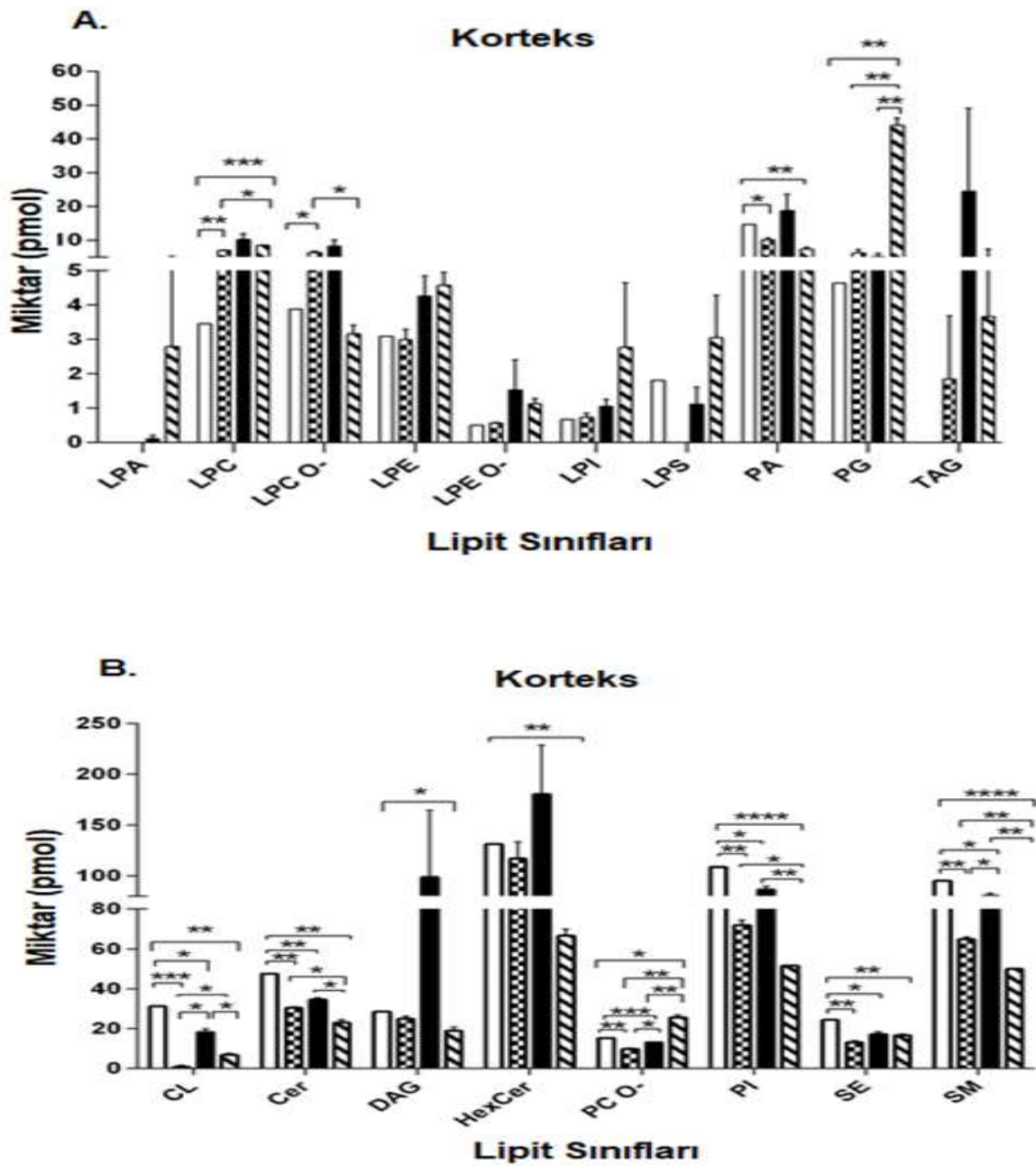
**Şekil 61.** (A) *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-1 proteininin immunositoflorosan ile analizi. (yeşil ışımalar APE1 proteinini maviler ise DAPI ile boyanmış nükleusları göstermektedir. (Fotoğraflar 40X büyütmede çekilmiştir.) (B) Yeşil ışımaların ImageJ programı ile yoğunluk ölçümünün hücre sayısına göre normalizasyonu. (\* $p < 0,05$ )

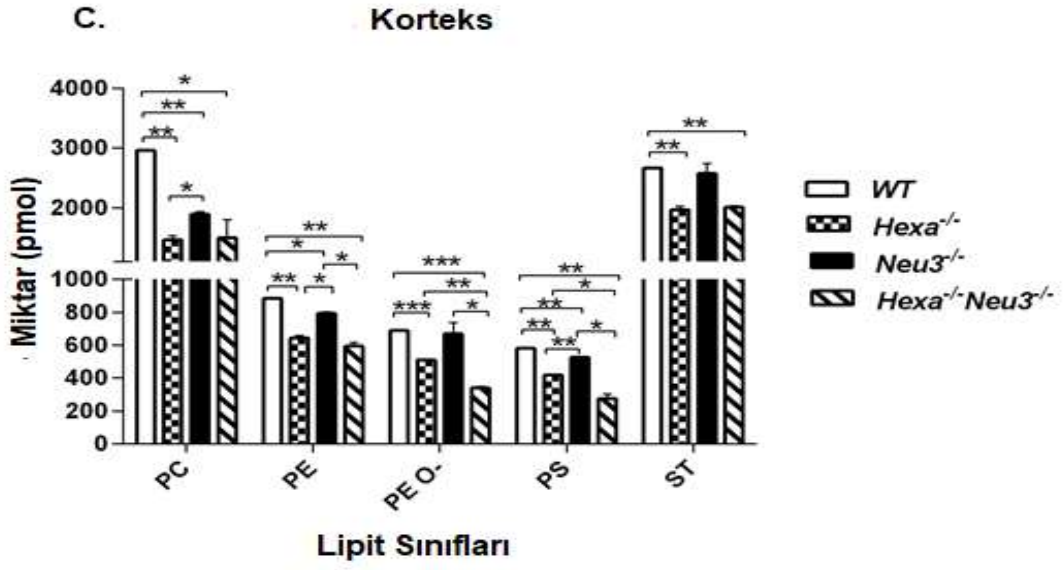
APE1/Ref-1 proteinin çekirdekdeki görevinin yanı sıra, detaylı olarak bilinmese de sitoplazmada da görevi olduğu ve bu proteinin Gaucher hastalığı gibi bazı lizozomal depo hastalıklarında artan sitoplazmik ekspresyonun varlığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Deganuto ve ark, 2007). *WT*, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup>, *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin ölümsüz fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-1 proteininin immunositokimyasal analizi sonucunda hem *Hexa*<sup>-/-</sup> hem de *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin fibroblastlarında *WT* ile karşılaştırıldığında anlamlı bir artış gözlenmiştir (Şekil 61). Bu durum *WT* (normal) fareler ile karşılaştırıldığında her üç genotipteki faredede geçerli oksidatif strese'ki artış ile ilişkilendirilebilir.



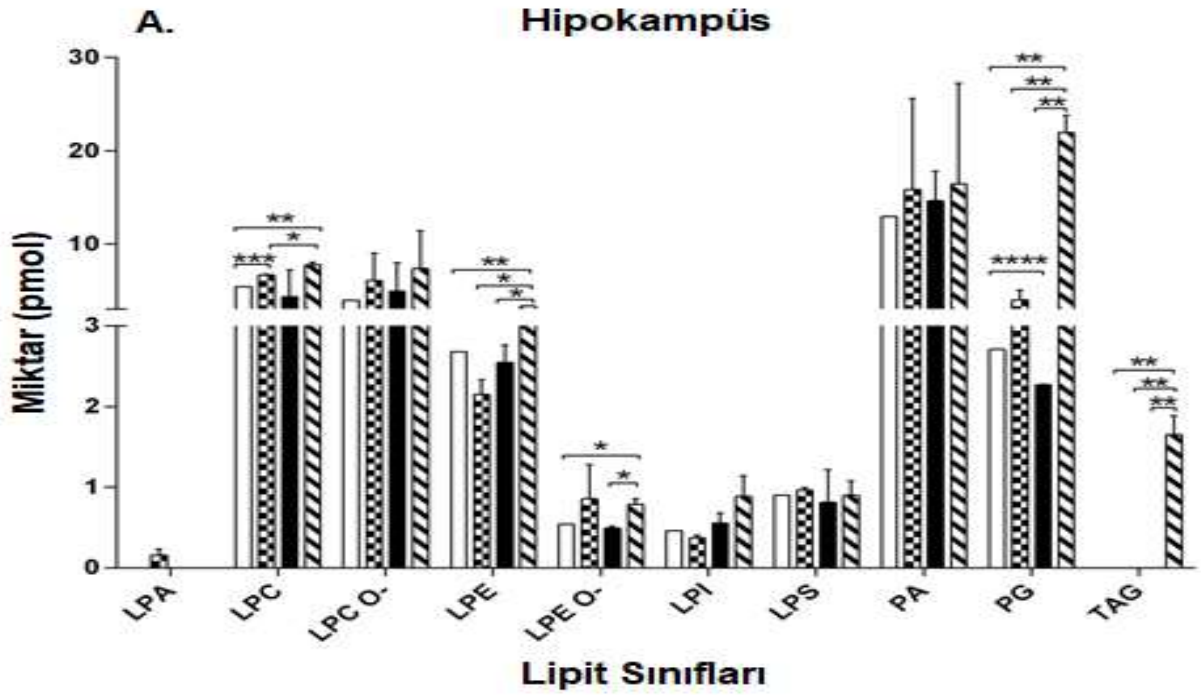
#### 4.6. İkincil Yağ Metabolizması Analizleri

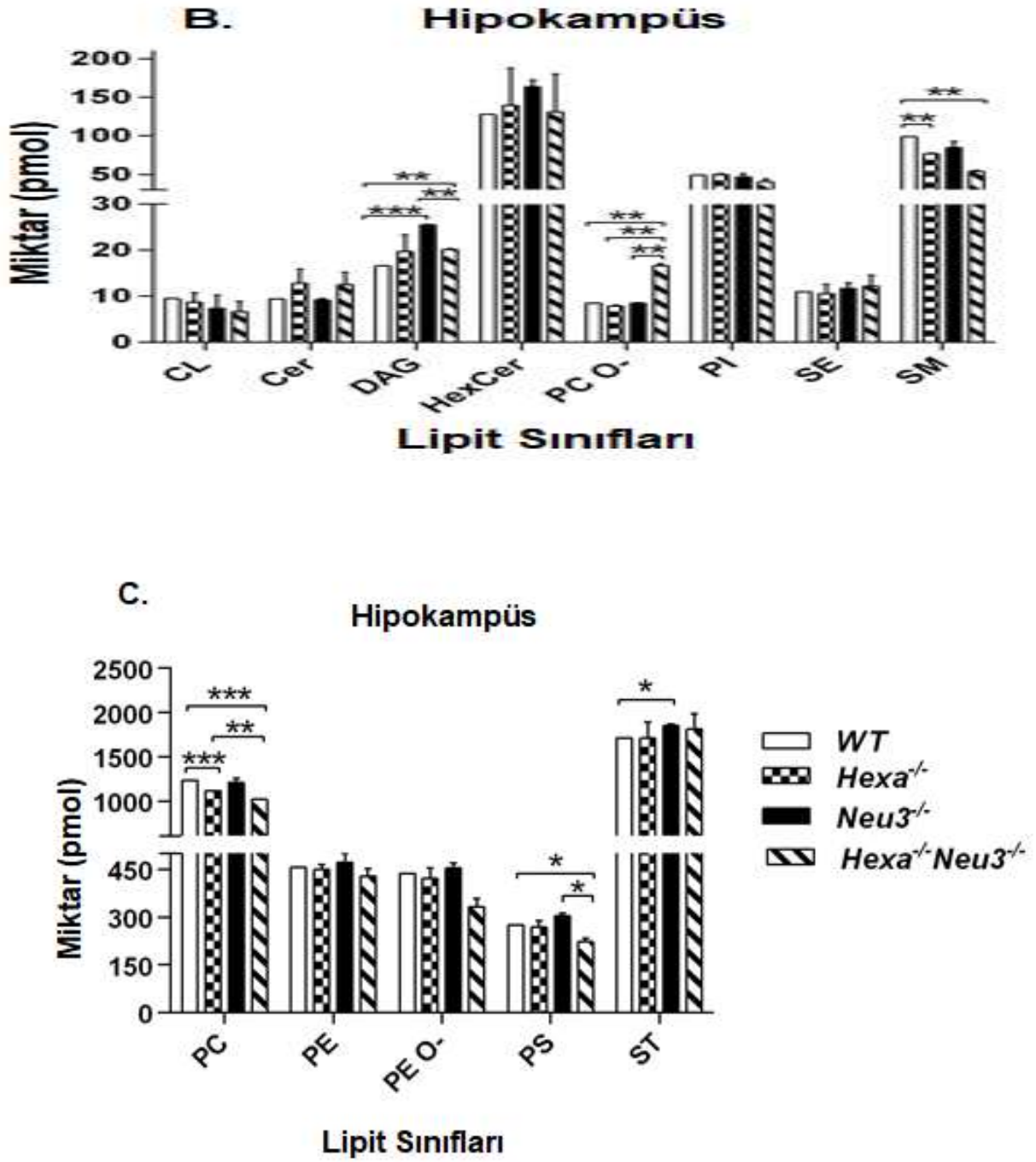
Lipidom analiz ile 23 farklı (LPA, LPC, LPC-O, LPE, LPE-O, LPI, LPS, PA, PG, TAG, CL, Cer, DAG, HexCer, PC-O, PI, SE, SM, PC, PE, PE-O, PS ve PT) yağ molekülünün 4 farklı genotipde 4.5 aylık farelerin 2 farklı beyin bölgesindeki (korteks ve hipokampus) profili çıkarılmıştır.





**Şekil 62.** (A,B,C) 4.5 aylık WT, *Hexa*<sup>-/-</sup>, *Neu3*<sup>-/-</sup> ve *Hexa*<sup>-/-</sup>*Neu3*<sup>-/-</sup> farelerinin **korteks** bölgesinde bulunan ikincil yağlar için lipidom kütle spektrometre analizi (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001).





**Şekil 63.** (A,B,C) 4.5 aylık WT, Hexa<sup>-/-</sup>, Neu3<sup>-/-</sup> ve Hexa<sup>-/-</sup>Neu3<sup>-/-</sup> farelerinin hipokampus bölgesinde bulunan ikincil yağlar için lipidom kütle spektrometre analizi (n=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001, \*\*\*\*p<0.0001).



İkincil yağların lipidom analizi sonuçlarına göre korteks ve hipokampüs bölgelerinde farklı lipitler için genotipler arası farklar gözlenmiştir. Ancak bu farklar arasında ikincil lipidlerin patolojide rolünü açıklamada yeterli değildir ancak daha kapsamlı araştırmalar ile *Hexa-/-Neu3-/-* farelerinde gözlenen patoloji ile ilişkilendirilebilir (Şekil 62,63). Projemizin bu bölümünde sadece *Hexa-/-Neu3-/-* farelerin değil aynı zamanda *Hexa-/-* ve *Neu3-/-* farelerinde korteks ve hipokampüs bölgesinde yağların profili ilk kez çıkarılmış ve WT ile karşılaştırılmış. Benzer şekilde lipidom analizi ile WT farelerin iki farklı beyin bölgesindeki minör ve major yağların dağılımı ve miktarı (1 pmol-4000 pmol) hakkında literatürdeki çalışmalarda henüz rapor edilmemiş olan bilgiler elde edilmiştir. İkincil yağların lipidom analizleri sonucu farklı genotipteki farelerde birbirlerine kıyasla istatistiksel olarak önemli miktarda artan yada azalan yağ profilleri ile elde edilmiştir. Bunların arasında en önemli fark *Hexa-/-Neu3-/-* farelerdeki PG (phosphatidylglycerol) miktarıdır.



TÜBİTAK

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Fareler, türler arasındaki genetik ve fizyolojik benzerlikler nedeniyle insan hastalıklarını ve biyolojilerini araştırmak için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında ölümcül bir çocukluk çağı hastalığı olan Tay-Sachs hastalığının fare modeli (*Hexa-/-Neu3-/-*) hastalığın hücresel patolojisini daha iyi anlamak amacı ile ayrıntılı analiz edilmiştir.

Nadir rastlanılan bir hastalık olan Tay-Sachs otozomal çekinik olarak kalıtılan ve GM2 gangliosidosis olarak isimlendirilen bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalıkta  $\beta$ -hekzosaminidaz A (HexA) enzim eksikliği sonucu özellikle sinir hücre lizozomlarında GM2 gangliosid adlı glikolipid birikmektedir. Bunun sonucunda özellikle sinir sistemi ciddi hasar görmektedir. Tay-Sachs hastaları doğumdan sonraki ilk bir kaç ay normal gelişim göstermektedir. Ancak hastalık çok hızlı ilerlemekte ve kısa sürede sağırılık, körlük, yutma zorluğu, kas deformasyonu, paraliz ve epilepsi gibi klinik bulgular ortaya çıkmaktadır. Tedavisi bulunmayan Tay-Sachs hastalığında çocuklar 3-4 yaşlarında ölmektedir. Tay-Sachs farelerinde (*Hexa-/-*) ise  $\beta$ -hekzosaminidaz A kodlayan gen “knockout” edilmiş olmasına rağmen normal bir fenotip ile karşılaşmıştır (Phaneuf ve ark. 1996). Öyleki Tay-Sachs hastalarının tam tersine  $\beta$ -hekzosaminidaz A eksikliği olan fareler normal yaşamlarını sürdürmekte ve herhangi bir önemli nörolojik bulgu göstermemektedir. *Hexa-/-* farelerde normal fenotipin görülmesi sialidaz enzimlerinin GM2 gibi glikolipidlerin yıkım reaksiyonlarında rol aldığını düşündürmüştür. Sadece farede olduğu düşünülen bir ‘by-pass’ mekanizması ile GM2 gangliosidinin bir yada birden fazla sialidaz enzimi (Neu1, Neu2, veya Neu3) tarafından önce GA2 adlı bir glikolipid’e yıkıldığı ve daha sonra  $\beta$ -Hekzoaminidaz B tarafından laktozilseramid’e yıkıldığı ileri sürülmüştür. Sialidaz enzimleri içinde gangliosit özgül plasma zar sialidazı olarak bilinen Neu3 (Neuraminidaz 3) sialidazın bu yıkımda önemli olabileceği fikrinden yola çıkarak EMBO Yerleşim Desteği ve Marie Cruie Geriye dönüş projeleri desteği ile *Hexa-/-* ve *Neu3-/-* farelerini çiftleştirerek (Phaneuf ve ark. 1996; Yamaguchi ve ark. 2012) *Hexa-/-Neu3-/-* fare modelini Tay-Sachs hastalığı modeli olarak elde etmeyi başardık. Elde edilen çift enzim eksikliği olan fareler 3-4 aylıkken anormal GM2 gangliosid birikimine bağlı olarak tremor (titreme) ve ataxia (kas koordinasyon bozukluğu) gibi nörolojik bulgular göstermiştir ve bu fareler 4.5 aylıkken aniden ölmeye başlamıştır. Ulusal (Hacettepe ve Ankara Üniversitesi) ve uluslararası işbirlikleri (Almanya, Japonya) ile bu fare modelini moleküler biyolojik, ileri biyokimyasal (ör. LC-MS/MS analizleri), immünohistokimyasal, histolojik, patolojik, tomografik, davranışsal olarak analiz ederek Tay-Sachs hastalığının ilk ve geçerli tek fare modeli olduğunu kanıtlamayı başardık. Bu projemiz sürecinde daha önce elde etmiş

olduğumuz veriler etki değeri yüksek bir dergi olan Experimental Neurology dergisinde yayınlanmıştır (Seyrantepe ve ark. 2018, Murine Sialidase Neu3 facilitates GM2 degradation and bypass in mouse model of Tay-Sachs disease. Exp Neurol. Jan;299(Pt A):26-41). Bu yayınıımız ayrıca 2018 yılı TGC Sedat Simavi Sağlık Bilimleri Övgü ödülü almıştır.

Lizozomal depo hastalıkları çeşitli biyomoleküllerin yıkımında görev alan enzimlerin eksikliği sonucu ortaya çıkan kalıtsal hastalıklardır. Bu hastalıklar belirli bir gende bir yada daha fazla mutasyon sonucu lizozomal enzimin aktivitesinin önemli derecede azalması sonucu ortaya çıkarlar (Reuser ve Drost 2006). Bu durum özellikle glikosifingolipid ve glikozaminoglikan gibi biyomoleküllerin lizozomlarda birikimi ile belirlenir. Sonuç olarak ortaya çıkan lizozomal fonksiyon bozukluğu hücresele patolojiye (ör. **Apoptoz ve Otofaji**) ve organ ya da dokuların yapı ve fonksiyonlarında değışimlere sebep olur. Çoğu lizozomal depo hastalıkları sınırlı yaşam süreleri olan ölümcül hastalıklardır. Tüm diğer kalıtsal hastalıklar gibi lizozomal depo hastalıklarının tedavisi için yeni terapi yöntemlerinin geliştirilmesi için araştırmalar sürdürölmektedir. İleride yeni terapi yöntemleri geliştirerek hastalığın model organizması olan farelerde uygulamak amaçı ile *Hexa-/-Neu3-/-* fare modeli ve *WT*, *Hexa-/-* ile *Neu3-/-* farelerini karşılaştırmalı olarak beyin dokusunda ve fibroblastlarda **ilerleyen (2.5 ve 4.5 aylık)** hastalık patolojisinde **hücre ölümü, otofaji, reaktif oksitativ türler ve ikincil yağ birikimi** açısından araştırdık.

Lizozomal depo hastalıklarında Tay-Sachs hastalığında GM2 gangliosit birikiminde olduğu gibi yıkılamayan subsratların lizozomlar içerisinde birikmesi zamanla hücrelerin şişmesine, hücre fonksiyonlarının bozulmasına ve hücre ölümüne neden olur (Tardy ve ark, 2004). Birçok lizozomal depo hastalığında nöral dejenerasyon görülür ve bunun sebebi **apoptotik** hücre ölümüdür. Endoplasmik retikulum ve oksidatif stresin lizozomal depo hastalıklarında hücrelerdeki apoptozu kolaylaştırdığı bilinmektedir.

Projemizde çeşitli moleküler biyolojik yöntemler kullanarak *Hexa-/-Neu3-/-* ve kontrol grubu farelere (*WT*, *Hexa-/-* ve *Neu3-/-*) ait farklı beyin bölgeleri ile fibroblast hücrelerinde öncelikle apoptoz ile ilişkili ER stres marker genleri (ATF6, Calnexin ve XBP1) ile oksidatif stres marker genlerinin (superoxide dismutase-2 (SOD2), catalase ve thioltransferase-1 (TTase1)) ifadesini çalıştık. ATF6 gen ifade oranında çalışılan bölgelerde *Hexa-/-Neu3-/-* faresi için belirgin bir fark görülmemiştir. Calnexin gen ifade oranı ise beyincik bölgesi için 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* farelerde 2.5 aylık fareler ile karşılaştırıldığında yaşa bağlı anlamlı bir artış gösterirken, diğer bölgelerde belirgin bir fark gözlenmemiştir ve bu bilgiler literatür ile uyumludur. XBP1 gen ifade oranı 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresi için *Hexa-/-* ve *Neu3-/-* faresi ile karşılaştırıldığında bütün bölgelerde literatür bilgilerinin aksine anlamlı bir azalma göstermiştir ve bu durum yaşa bağlı değildir. 2.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* faresinin beyincik ve hipokampus bölgelerinde ise *WT* ile karşılaştırıldığında kesilmemiş XBP1 gen



ifade oranı belirgin bir azalma göstermiştir. Bu kesilmemiş XBP1 gen ifade düzeyindeki azalma ER stres seviyesinde bu yaş grubunda beklenmeyen yeni bir veri olarak değerlendirilmiştir.

Tay-Sachs hastalığı fare modelinin (*Hexa-/-Neu3-/-*) korteks, beyincik, hipokampus ve talamus bölgesi 2.5 aylık ve 4.5 aylık *Hexa-/-*, *Neu3-/-* ve WT farelerin aynı beyin bölgeleri apoptoz belirteçleri olan Kaspas12 ve 9 yanısıra Kaspas3 genleri için Western Blot yöntemi ile analiz edilerek karşılaştırılmıştır. Sadece Kaspas 9 düzeyinin hem 2.5 hemde 4.5 aylık *Hexa-/-Neu3-/-* farelerin talamus bölgesinde arttığı tesbit edilmiştir. *Neu3-/-* farelerde ise benzer şekilde Kaspas 9 düzeyinde artış vardır ve *Hexa-/-Neu3-/-* farelerdeki verilerle benzerlik göstermektedir. Bu artışın *Hexa-/-Neu3-/-* farelerdeki 2. enzim eksikliği olan Neu3 sialidaz eksikliğine bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Kaspas3 düzeyinin ise hem 2.5 hem de 4.5 aylık *Neu3-/-* farelerde tüm denemelerimizde korteks bölgesi hariç beyincik, talamus ve hipokampus'te yüksek çıkması ise bu enzimin ganglioside metabolizması ile bağlantılı apoptoz süreçlerinde rolü olabileceğini düşündürmüştür. Projemiz süresince apoptoz varlığını DNA fragmentasyon analizleri, RT-PCR ve WBlot analizleri ile göstermeye çalıştık ancak en anlamlı verileri Insitu Tunel analizi ile elde ettik (Şekil 4).

Lizozom hücrel makromoleküllerin yıkımları için gerekli enzimleri içeren asidik bir organeldir. Bu yıkım enzimlerinin herhangi birinin eksikliği durumunda hücrelerin lizozomlarında çok miktarda yıkılmamış makromolekül birikir. Eksikliği olan enzimin substratının birikmesi ikincil etkilere sebep olur ve endozom-otofaji-lizozom sisteminin yanısıra hücredeki mitokondri, ER, Golgi gibi organelleri, kısaca tüm hücrel fonksiyonları etkileyen bir kaskat başlatır (Platt ve Lachmann, 2009). Lizozom bir organel olarak **otofaji** için kritik öneme sahiptir. Öyleki lizozomal depo hastalıklarında yıkılamayan ürünlerin lizozomlarda birikmesi bu hastalarda otofaji yolağının bozulmuş olabileceği ve bu bozulmanın da hastalığıdaki patolojide rolü olabileceği öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalar birçok farklı lizozomal depo hastalığında otofaji yolağının bozulmuş/etkilenmiş olduğunu göstermektedir. Ör. Sifingomyelinin yıkılamadığı lizozomal depo hastalığı olan NPC'de hastaların fibroblast hücrelerinde otofaji sırasında aktive olan Beclin-1 proteininin yüksek miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. Ayrıca *NiemanPickC-/-* farelerinde otofaji özellikle beyin dokusunda çalışılmış ve otofaji markerlarından mikrotübül-ilişkili protein 1 hafif zincirinin (LC3), LC3-1 olarak geçen sitozolik halinden değiştirilmiş hali olan LC3-II'ye çok daha hızlı dönüştüğü ve otofagozom membranı ile etkileşerek otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir. LC3-II proteini hücrede sadece otofagozom membranı ile etkileşen diğer membranlarla etkileşmeyen özel bir proteindir. Ayrıca NPC'de otofajinin aktivasyonunun Beclin-1 proteininin aktive edilmesi ile gerçekleştiği gösterilmiştir (Pacheco ve ark. 2007). Pompe hastalığı ise lizozomal asit-alfa-glukozidaz enzim eksikliği olan ve lizozomlarda glikojenin biriktiği, buna bağlı olarak da iskelet ve kalp kaslarının ciddi bir şekilde etkilendiği bir hastalıktır. Glikojen birikim sadece lizozomlarda kalmamış, yıkılamayan glikojen



otofagozomlarda da birikmiş ve hücrede çok sayıda vakuoler yapının oluşmasına neden olmuştur. Yapılan araştırmalarda bu vakuollerde LAMP-1 proteinin LC3-II ile birlikte lokalize olduğu gösterilmiştir (Fukuda ve ark. 2006; Raben ve ark. 2007). MSD hastalığı fare modelinde fare beyinlerinde cerebral korteks, talamus ve cerebellum kısımlarında yapılan çalışmalarda otofagozom markeri LC3 incelenmiş, LC3-I'in LC3-II'ye dönüşmüş halinin miktarındaki artışın otofagozom sayısı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Settembre ve ark. 2008). Aynı zamanda yine otofajide olan problemler sonucu biriken ubiquitin eklenmiş proteinlere spesifik p62 proteininde de artış görülmüştür (Settembre ve ark. 2008; Raben ve ark. 2009). Fabry hastalığı alfa-galaktozidaz A enzim eksikliği sonucu anormal glikosipingolipid katabolizması olan lizozomal depo hastalığıdır. Böbrek hücrelerinde LC3 proteini üzerine yapılan çalışmalarda otofajik vakuollerin bu hastalıkta da çok sayıda birikmiş olduğunu göstermiştir (Chevrier ve ark. 2010). Glukozilseramidaz enzim eksikliğine bağlı olarak glukozilseramid birikimi olan Gaucher hastalığında da otofajinin bozulduğu ve LC3-II'nin miktarının arttığı gösterilmiştir (Tatti ve ark. 2011).  $\beta$ -galaktozidaz enzim eksikliği sonucu GM1 gangliosit birikimi olan GM1 gangliosidosis faresinde LC3-II'nin ve Beclin1'in artışı ile otofajinin anormal aktivasyonu gösterilmiş ve bu direk hastalığın patolojisi ile ilişkilendirilmiştir (Takamura ve ark. 2008; Osellame ve ark. 2014). Otofajinin bozulmuş olması GM2 ve GA2 birikimi olan Sandhoff hastalığında da gösterilmiştir (Vinter ve ark. 2010; Platt ve ark. 2012). Benzer şekilde sonuçlarımız Tay-Sachs hastalığı fare modelinde (*Hexa-/-Neu3-/-*) farklı beyin bölgelerinde korteks, beyincik, hipokampus ve talamusda *Hexa-/-*, *Neu3-/-* ve *WT* fareler ile karşılaştırıldığında otofaji süreçlerinde yaşa bağlı olarak farklılıklar olduğunu göstermiştir. Ancak her bir gruptan 3 farklı farenin farklı beyin bölgeleri ile elde edilen sonuçları yorumlamakta güçlükle karşılaştık. Örneğin W Blot sonuçlarında özellikle LC3-II ve p62 bantlarının farklı beyin bölgelerinde varlığı bu bölgelere özel otofajik akışın var olabileceğini düşündürmüştür. Benzer şekilde farklı farelerin (n=3 yapılmıştır) olası 'steady state' durumun farklı olmasında bu bölümdeki WBlot verilerin değerlendirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak LC3-II ve LAMP1 ile yapmış olduğumuz IHC çalışmaları *Hexa-/-Neu3-/-* farelerde artan otofaji akış ve lizozom birikiminin doğru orantılı ilişkisinin varlığını göstermiştir. *Hexa-/-Neu3-/-* farelerde otofajik akış hakkında dokudan çok bu farelerden elde edilecek sinir hücre hatlarında indüklenme sonucu oluşturulacak stress şartları ile daha ayrıntılı bilgi toplamak mümkün olacaktır.

Bilindiği gibi lizozomlarda gerçekleşen birikimden dolayı otofaji yolağı, etkilenme mekanizması hastalığa bağlı olarak değişse (otofajinin artması ya da engellenmesi ve vakuollerin birikmesi) de tüm lizozomal depo hastalıklarında bozulmaktadır. Otofaji yolağında meydana gelen bu değişim ve bozulmalar nörodejenerasyon ile ilişkilendirilmektedir (Settembre ve ark. 2008). Otofajinin artması ya da azalması hücre içinde diğer yolları da etkilemektedir ör. kaspazların aktivasyonu sonucu apoptoza neden olabilmektedir (Kiselyov ve ark. 2007). Çalışmamızda *Hexa-/-Neu3-/-* farelerinde

anormal GM2 gangliosit miktarındaki ve daha önceki çalışmamızda elektron mikroskop analizinde gösterdiğimiz gibi (Seyrantepe ve ark., 2018) lizozom sayısındaki anormal artışa bağlı olarak otofaji mekanizmasının etkilendiği ve ER stress gibi henüz çalışılmamış diğer mekanizmalarında tek yada birlikte etkisi ile hücre ölümü ve nörodejenerasyonun gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

Birçok çalışma reaktif oksijen türlerinin (ROS) lizozomal depo hastalıklarında görülen hücre ölümlerinin en önemli etkeni ya da genel araçları olduğunu göstermiştir (Wei ve ark.2008). GM1 ve GM2 gangliosidosisde uyarılabilir nitrik oksit sentez enzimi ve nitrotyrozinin microglia ve makrofaj hücrelerinde (Jeyakumar ve ark. 2003) ve ROS'un Fabry hastalık modellerindeki artışı görülmektedir (Shen ve ark. 2008). Niemann-Pick C 1 (NPC1) hastalarının bağ doku microarray analiz sonuçlarında oksidatif stresin artırılmasının, ROS' un ve yağ peroksitasyonunun artışının akut oksidatif travmadan sonraki dönemde bağ dokularını hücre ölümlerine daha yatkın hale getirdiğini göstermiştir. ROS'un ayrıca lizozomal depo hastalıklarının patolojisinin açıklanmasında çok önemli bir rolü olabileceği tahmin edilmektedir (Vitner ve ark., 2010). Fabry hastalık modellerinde alpha-galactosidase A eksikliğinin lizozomlarda globotriaosylseramid (Gb(3)) birikimini ortaya çıkardığı gözlenmiştir. Fabry hastalığında, Gb(3)'ün damar endotellerinde birikimi ROS'un artan üretimi ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir. Fabry hastalarının endotel hücrelerindeki plasma örneklerinde ROS artışının kontrol grublarına göre önemli miktarda olduğu gözlemlenmiştir (Shen ve ark. 2008). Ayrıca Fabry hastalarının eritrositlerinde düşük seviyede gözlemlenmesi; glutathione, glutathione peroksidaz ve superoksit dismutaz/catalaz oranındaki artış ile ilişkilendirilmiştir (Biancini ve ark. 2012). ROS'lar indirgenmesi tamamlanmamış oksijen sonucunda oluşan reaktivitesi yüksek moleküller olmaları nedeni ile otofaji'de önemli derecede rol oynamaktadırlar. Fizyolojik koşullar altında mitokondride kullanılan oksijenin %1-3' lük kısmı elektron taşıma zinciri ile ROS' a dönüştürülerek en başta gelen ROS kaynaklarından biri özelliğini taşımaktadır. Açlık (otofajinin potansiyel tetikleyicisi) faktörünün ROS seviyesini arttırdığı ve anti-oksidantlar ile yapılan tedavinin ise açlık ile meydana gelen otofajide iyileşme görülmesi rapor edilmiştir. Gaucher hastalığı (GD) bir lizozomal depo hastalığıdır ve glukosylseramide (GlcCer)'ın farklı vücut hücrelerinde birikmesi ve hücresel yetmezliklere neden oldukları bilinmektedir. GlcCer biyolojik membranların bileşeni ve kompleks glikosipingolipidlerin (GSLs) biyo yapım ve yıkım yollarında önemli ara basamak moleküllerinden biridir. GlcCer'in GD'de birikimi ciddi patolojik sonuçlara neden olmaktadır. Seramid ve GSL sinyal iletim yollarına dahil olarak ROS' a sebep olurlar. Özellikle laktosilseramide ve GD3 moleküllerinin Gaucher dokularında birikimi gözlenmiş ve farklı oksit indirgenlerini aktive ettiği rapor edilmiştir, bundan dolayı GSL yolağındaki dengesizliklerin GD'nin temel ROS seviyesini GD hücrelerinde arttırması olarak karakterize edilmiştir. Fibroblast hücrelerinde ROS seviyesinin ve karbonil içeriğinin GD hastalarında önemli ölçüde arttığı gözlemlenmiştir. Oksidatif strese karşı adaptif cevaplarda

APE1/Ref-1 proteininin önemli rolü olduğu bilinmektedir. Sitoplazmik APE1/Ref-1 protein seviyesi GD fibroblast hücrelerinde APE1/Ref-1 proteini kontrol gruplarına göre önemli miktarda fazla olduğu gösterilmiştir (Deganuto ve ark.2007). Ancak gerek WBlot gerekse immünositoflorosan analizler ile elde ettiğimiz verilerimiz APE1/Ref1 düzeylerinde 4 farklı genotip arasında anlamlı fark olmadığını göstermiştir. Çalışmamızda yukarıda literatürdeki bilgiler doğrultusunda *Hexa-/-Neu3-/-* farelerinde GM2 gangliosit miktarındaki artışa bağlı olarak ROS'un hücre ölümünden sorumlu mekanizmalarda ikincil rol oynayıp oynamadığı araştırılmıştır. Protein yan karbonil grupları oksidatif hasarların tesbit edilebilmesi için ayırt edici önemli bir özelliktir. Bu nedenle karbonil grupların ölçümü OxyBlot Protein Oxidation Detection kiti kullanılarak yapılmıştır ancak *Hexa-/-* ve *Hexa-/-Neu3-/-* fareler karşılaştırıldığında önemli bir fark gösterilememiştir. *Hexa-/-Neu3-/-* farelerin beyin dokusundaki patolojinin hücre içi redoks durumunun bozulması ile ilişkilendirilmesi için sinir ve glia hücre hatlarının kurulması ve analiz edilmesi uygun olabilir.

Endozomal/lizozomal sistemin temel rolü hücre yüzeyinden gelen substratların parçalanması ve hücre yüzeyine geri döndürülmesidir. Bu sistem endositosis ve otofaji ile sağlanır. Herhangi bir lizozomal enzimdeki eksiklik tüm bu sistemin fonksiyonunu bozabilir ve bir çok farklı substratın birikmesine sebep olabilir. Tay-Sachs hastalarının beyin dokusundan yapılan çalışmalarda birincil depo ürünü GM2 gangliositinin yanında GA2, laktosilseramid ve glukoserebrosid gibi ikincil yağ ürünlerinde biriktiği gösterilmiştir. Bu hastalarda ayrıca fosfolipid, serebrosid, sfingomiyelin, kolesterol ve kolesterol ester gibi ikincil metabolitlerin arttığı da rapor edilmiştir (Walkley ve ark, 2004). Yapılan LC-MS/MS analizlerinde 4 farklı genotipteki farelerin korteks ve hipokampus bölgelerinde farklılıklar tesbit edilmiştir. Elde edilen veriler içinde en önemlisi *Hexa-/-Neu3-/-* fare beyin dokusunda PG (phosphatidylglycerol), LPE (lysophosphatidylethanolamine) ve PC-0 (phosphatidylcholine) yüksek bulunmuştur. Bu yağların yıkım ve yapıp reaksiyonlarının nasıl etkilendiği ayrıca hücre içi trafikte ve lizozom-endozom ilişkisinde *Hexa-/-Neu3-/-* farelerin lizozomlarında anormal biriken GM2 miktarı ile etkileşimi ileride başka araştırmaların konusu olacaktır. Benzer şekilde bu yağların yüksek miktarı farelerde uygulanacak ilaç tedavisine yanıtta monitör edilebilir. Literatürde lizozomal hastalık modellerinin LC-MS/MS ile yağ profillerinin çıkarıldığı çalışmalar çok kısıtlıdır (Jones ve ark, 2018). Projemizin bu bölümündeki çıktılar 'kısa rapor' olarak yayına hazırlanmaktadır.

Son 25 yılda lizozomal hastalıkların patofizyolojisi ve tedavileri üzerine yapılan araştırmalarda kısıtlı olsa önemli başarılar elde edilmiştir. Bu çalışmaların sonucunda bazı lizozomal hastalıklarda tedavi uygulaması mümkün olmaktadır (Pastores 2010). Bu tedavi yöntemlerinden biri olan enzim replasman tedavisinde (ERT) spesifik bir enzim eksikliği olan hastalara rekombinant bir enzim verilmektedir (Connock ve ark. 2006). Ör. Nöropatik olmayan Gaucher hastalığı gibi



lizozomal hastalıklarda enzim replasman tedavisi başarılı olmasına rağmen bu tedavi ile kan-beyin bariyerinin geçilememesi sonucu merkezi sinir sistemi tutulumu engellenememektedir (Proia ve Wu, 2004). Substrat redüksiyon terapisi (SRT) ise lizozomlardaki enzim eksikliğinden dolayı yıkılamayan maddelerin sentezini engelleyen küçük moleküllerin kullanılmasına ve biriken maddelerin sentezinin azaltılmasına dayanır (Beck, 2007). Bu terapi ile lizozomal depo hastalıklarında biriken ör. glikosifingolipit gibi yağların sentezini durdurmak için çeşitli inhibitörler, hastalığın yaratılan hayvan modellerinde denenmektedir. Sandhoff ve Gaucher hastalığı gibi lizozomal depo hastalıkları için hayvan modellerinde kullanılan inhibitörlerin yararlı bir terapi yöntemi olduğu semptomların oluşumundaki gecikmeler sonucu anlaşılmıştır. Sandhoff fare modelinde (*Hexb*<sup>-/-</sup>), 'miglustat' ile yapılan çalışmalarda gangliositlerin merkezi sinir sisteminde çok daha yavaş bir birikim gösterdiği rapor edilmiştir (Jeyakumar ve ark. 2003). ERT ve SRT'lerinin geliştirilebilmesi için hücre patolojisinde rol alan apoptoz, ROS seviyeleri ve otofaji gibi temel mekanizma ve yolların aydınlatılması çok önemlidir. İleride Tay-Sachs hastalığına tedavi geliştirebilmek için hücre ve fare modelleri ile yapacağımız çalışmalarda bu proje kapsamında elde ettiğimiz sonuçlar yol gösterici olacaktır.

## KAYNAKÇA

- Ballabio A, Gieselmann V. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2009 Apr 1;1793(4):684-96.
- Beck M. New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. *Hum Genet*. 2007 Mar;121(1):1-22.
- Biancini GB, Vanzin CS, Rodrigues DB, Deon M, Ribas GS, Barschak AG, Manfredini V, Netto CB, Jardim LB, Giugliani R, Vargas CR. Globotriaosylceramide is correlated with oxidative stress and inflammation in Fabry patients treated with enzyme replacement therapy. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Feb;1822(2):226-32.
- Campeau PM, Rafei M, Boivin MN, Sun Y, Grabowski GA, Galipeau J. Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood*. 2009 Oct 8;114(15):3181-90.
- Chévrier M, Brakch N, Céline L, Genty D, Ramdani Y, Moll S, Djavaheri-Mergny M, Brasse-Lagnel C, Annie Laquerrière AL, Barbey F, Bekri S. Autophagosome maturation is impaired in Fabry disease. *Autophagy*. 2010 Jul;6(5):589-99.
- Connock M, Juarez-Garcia A, Frew E, Mans A, Dretzke J, Fry-Smith A, Moore D. A systematic review of the clinical effectiveness and cost-effectiveness of enzyme replacement therapies for Fabry's disease and mucopolysaccharidosis type 1. *Health Technol Assess*. 2006 Jun;10(20):iii-iv, ix-113.
- d'Azzo A, Tessitore A, Sano R. Gangliosides as apoptotic signals in ER stress response. *Cell Death & Differentiation*. 2006 Mar;13(3):404.
- Deganuto M, Pittis MG, Pines A, Dominissini S, Kelley MR, Garcia R, Quadrifoglio F, Bembi B, Tell G. Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress. *Journal of cellular physiology*. 2007 Jul;212(1):223-35.
- Fukuda T, Roberts A, Ahearn M, Zaal K, Ralston E, Plotz PH, Raben N. Autophagy and lysosomes in Pompe disease. *Autophagy*. 2006 Oct-Dec;2(4):318-20.
- Huang JQ, Trasler JM, Igdoura S, Michaud J, Hanai N, Gravel RA. Apoptotic cell death in mouse models of GM2 gangliosidosis and observations on human Tay-Sachs and Sandhoff diseases. *Human molecular genetics*. 1997 Oct 1;6(11):1879-85.
- Jeyakumar M, Thomas R, Elliot-Smith E, Smith DA, van der Spoel AC, d'Azzo A, Perry VH, Butters TD, Dwek RA, Platt FM. Central nervous system inflammation is a

hallmark of pathogenesis in mouse models of GM1 and GM2 gangliosidosis. *Brain*. 2003 Apr;126(Pt 4):974-87.

- Jones EE, Zhang W, Zhao X, Quiason C, Dale S, Shahidi-Latham S, Grabowski GA, Setchell KDR, Drake RR, Sun Y. Tissue Localization of Glycosphingolipid Accumulation in a Gaucher Disease Mouse Brain by LC-ESI-MS/MS and High-Resolution MALDI Imaging Mass Spectrometry. *SLAS Discov*. 2017 Dec;22(10):1218-1228.
- Kiselyov K, Jennings Jr JJ, Rbaibi Y, Chu CT. Autophagy, mitochondria and cell death in lysosomal storage diseases. *Autophagy*. 2007 May 10;3(3):259-62.
- Osellame LD, Duchen MR. Quality control gone wrong: mitochondria, lysosomal storage disorders and neurodegeneration. *Br J Pharmacol*. 2014 Apr;171(8):1958-72.
- Pacheco CD, Kunkel R, Lieberman AP. Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects. *Hum Mol Genet*. 2007 Jun 15;16(12):1495-503.
- Pastores GM. Therapeutic approaches for lysosomal storage diseases. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2010 Aug;1(4):177-88.
- Phaneuf, D., Wakamatsu, N., Huang, J.Q., Borowski, A., Peterson, A.C., et al. (1996) "Dramatically different phenotypes in mouse models of human Tay-Sachs and Sandhoff diseases." *Hum Mol Genet* 5: 11–14.
- Platt FM, Boland B, van der Spoel AC. Lysosomal storage disorders: The cellular impact of lysosomal dysfunction. *J Cell Biol*. 2012 Nov 26;199(5):723-34.
- Platt FM, Lachmann RH. Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2009 Apr 1;1793(4):737-45.
- Proia RL, Wu YP. Blood to brain to the rescue. *J Clin Invest*. 2004 Apr;113(8):1108-10.
- Raben N, Baum R, Schreiner C, Takikita S, Mizushima N, Ralston E, Plotz P. When more is less: excess and deficiency of autophagy coexist in skeletal muscle in Pompe disease. *Autophagy*. 2009 Jan;5(1):111-3. Epub 2009 Jan 30.
- Raben N, Roberts A, Plotz PH. Role of autophagy in the pathogenesis of Pompe disease. *Acta Myol*. 2007 Jul;26(1):45-8.
- Ravikumar B, Sarkar S, Davies JE, Futter M, Garcia-Arencibia M, Green-Thompson ZW, Jimenez-Sanchez M, Korolchuk VI, Lichtenberg M, Luo S, Massey DC. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*. 2010 Oct;90(4):1383-435.



- Reuser AJ1, Drost MR. Lysosomal dysfunction, cellular pathology and clinical symptoms: basic principles. *Acta Paediatr Suppl.* 2006 Apr;95(451):77-82.
- Settembre C, Fraldi A, Jahreiss L, Spampinato C, Venturi C, Medina D, de Pablo R, Tacchetti C, Rubinsztein DC, Ballabio A. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.* 2008 Jan 1;17(1):119-29.
- Sango K, Yamanaka S, Hoffmann A, Okuda Y, Grinberg A, Westphal H, McDonald MP, Crawley JN, Sandhoff K, Suzuki K, Proia RL. Mouse models of Tay–Sachs and Sandhoff diseases differ in neurologic phenotype and ganglioside metabolism. *Nature genetics.* 1995 Oct;11(2):170.
- Settembre C, Fraldi A, Rubinsztein DC, Ballabio A. Lysosomal storage diseases as disorders of autophagy. *Autophagy.* 2008 Jan;4(1):113-4.
- Seyrantepe V, Demir SA, Timur ZK, Von Gerichten J, Marsching C, Erdemli E, Oztas E, Takahashi K, Yamaguchi K, Ates N, Demir BD. Murine Sialidase Neu3 facilitates GM2 degradation and bypass in mouse model of Tay-Sachs disease. *Experimental neurology.* 2018 Jan 1;299:26-41.
- Seyrantepe V, Landry K, Trudel S, Hassan JA, Morales CR, Pshezhetsky AV. Neu4, a novel human lysosomal lumen sialidase, confers normal phenotype to sialidosis and galactosialidosis cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2004 Aug 27;279(35):37021-9.
- Seyrantepe V., Canuel, M., Carpentier, S., Landry, K., Durand, S., Liang, F., Zeng, J., Caqueret, A., Gravel, R. A., Marchesini, S., Zwingmann, C., Michaud, J., Morales, C. R., Levade, T., Pshezhetsky, A. V. (2008) “Mice deficient in the Neu4 sialidase exhibit abnormal ganglioside catabolism and lysosomal storage.” *Hum. Mol. Genet.* 17 (11), 1556–1568.
- Seyrantepe, V., Lema, P., Caqueret, A., Dridi, L., Bel Hadj, S., Carpentier, S., Boucher, F., Levade, T., Carmant, L., Gravel, R. A., Hamel, E., Vachon, P., Di Cristo, G., Michaud, J. L., Morales, C. R., Pshezhetsky, A. V. (2010) “Mice doubly-deficient in lysosomal hexosaminidase A and neuraminidase 4 show epileptic crises and rapid neuronal loss.” *PLoS Genet.* 6 (9).
- Shen JS, Meng XL, Moore DF, Quirk JM, Shayman JA, Schiffmann R, Kanetski CR. Globotriaosylceramide induces oxidative stress and up-regulates cell adhesion molecule expression in Fabry disease endothelial cells. *Mol Genet Metab.* 2008 Nov;95(3):163-8.
- Takamura A, Higaki K, Kajimaki K, Otsuka S, Ninomiya H, Matsuda J, Ohno K, Suzuki Y, Nanba E. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Mar 14;367(3):616-22.



- Tanaka Y, Guhde G, Suter A, Eskelinen EL, Hartmann D, Lüllmann-Rauch R, Janssen PM, Blanz J, Von Figura K, Saftig P. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*. 2000 Aug;406(6798):902.
- Tardy C, Andrieu-Abadie N, Salvayre R, Levade T. Lysosomal storage diseases: is impaired apoptosis a pathogenic mechanism? *Neurochem Res*. 2004 May;29(5):871-80.
- Tatti M, Motta M, Salvioli R. Autophagy in Gaucher disease due to saposin C deficiency. *Autophagy*. 2011 Jan;7(1):94-5.
- Vitner EB, Dekel H, Zigdon H, Shachar T, Farfel-Becker T, Eilam R, Karlsson S, Futerman AH. Altered expression and distribution of cathepsins in neuronopathic forms of Gaucher disease and in other sphingolipidoses. *Hum Mol Genet*. 2010 Sep 15;19(18):3583-90.
- Vitner EB, Platt FM, Futerman AH. Common and uncommon pathogenic cascades in lysosomal storage diseases. *J Biol Chem*. 2010 Jul 2;285(27):20423-7.
- Walkley SU. Secondary accumulation of gangliosides in lysosomal storage disorders. In *Seminars in cell & developmental biology* 2004 Aug 1 (Vol. 15, No. 4, pp. 433-444). Academic Press.
- Walkley SU, Suzuki K. Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2004 Oct 11;1685(1-3):48-62.
- Wei H, Kim SJ, Zhang Z, Tsai PC, Wisniewski KE, Mukherjee AB. ER and oxidative stresses are common mediators of apoptosis in both neurodegenerative and non-neurodegenerative lysosomal storage disorders and are alleviated by chemical chaperones. *Hum Mol Genet*. 2008 Feb 15;17(4):469-77.
- Yamaguchi K, Shiozaki K, Moriya S, Koseki K, Wada T, Tateno H, Sato I, Asano M, Iwakura Y, Miyagi T. Reduced susceptibility to colitis-associated colon carcinogenesis in mice lacking plasma membrane-associated sialidase. *PLoS One*. 2012;7(7):e41132.
- Zou GM. Cancer stem cells in leukemia, recent advances. *Journal of cellular physiology*. 2007 Nov;213(2):440-4.

**TÜBİTAK**  
**PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje Yürütücüsü:	Prof. Dr. VOLKAN SEYRANTEPE
Proje No:	215Z083
Proje Başlığı:	Erken Başlangıçlı Tay-Sachs Hastalığı Fare Modelinde Hücresel Patolojinin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	
Danışmanlar:	AYTEN NALBANT ALDANMAZ, DEVİRİM GÖZÜAÇIK
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2016 - 15/07/2019
Onaylanan Bütçe:	565650.0
Harcanan Bütçe:	513271.12
Öz:	<p>Sialidaz enzimleri glikolipid ve glikoproteinlerin yapısında bulunan sialik asitleri uzatlaştırarak çeşitli hücresel olayları kontrol eden glikohidrolitik enzimlerdir. Memeli hücrelerinde 4 farklı sialidaz enzimi bulunmaktadır. Bunlar lizozomal (Neu1), sitosolik (Neu2), hücre zar sialidazı (Neu3) ve lizozomal sialidaz (Neu4) olarak isimlendirilirler. Neu4 ilk kez klonlanarak biyokimyasal özellikleri tanımlanmış ve in vitro şartlarda bu enzimin asitik pH'da GM2 gibi glikolipid grubundaki gangliosidlere karşı aktivitesi olduğunu gösterilmiştir (Seyran-tepe ve ark., 2004). Bir başka çalışmada ise GM2 gangliosidosis olarak bilinen Tay-Sachs hastalarına ait nöroglia hücrelerine Neu4 kodlayan plasmidin aktarılması sonucu lizozomlarda biriken GM2 gangliosidinin Neu4 tarafından yıkıldığı ve hücrelerde görülen patolojinin ortadan kalktığı gösterilmiştir (Seyran-tepe ve ark., 2008). In vitro şartlarda sialidaz enzimlerinin GM2 gangliosidini yıktığı bilinmekle birlikte, fenotip bulgusu bulunmayan Tay-Sachs hastalığı fare modelinde (Hexa-/-) gangliosid yıkım yolağında in vivo olarak sialidazların nasıl bir rol oynadığı bilinmemektedir. Bu amaçla Neu4 eksikliği olan fareler (Neu4-/-) yaratılmış (Seyran-tepe ve ark, 2008) ve β-hekzosaminidaz A eksikliği olan Tay-Sachs fare modeli (Hexa-/-) ile çiftleştirilerek Hexa-/-Neu4-/- fare modeli elde edilmiştir. Bu farelerin bir bölümünde epilepsi gibi Tay-Sachs hastalık bulguları ve beyin dokusunda anormal GM2 gangliosid birikimi tesbit edilmiştir (Seyran-tepe ve ark, 2010). Farelerin tümünde epilepsi görülmemesi Neu4'un modife edici bir gen ürünü olduğunu ve Neu3 gibi diğer sialidazların gangliosid yıkım yolağında rolü olabileceğini düşündürmüştür. Bu hipotezi test etmek amacı ile yaratılan Hexa-/-Neu3-/- farelerde ise beklenmedik şekilde erken başlangıçlı Tay-Sachs hastalığı fenotip bulguları vardır. Bu farelerde 3-4 aylıkken ataksi ve tremor gibi nörolojik bulgular gözlenmektedir ve Tay-Sachs hastalığının şimdiye kadar yaratılmış ilk ve tek modeli olma özelliğini taşımaktadır. 4.5 aylıkken aniden ölen bu yeni fare modelinde beyin ve organlarda anormal GM2 gangliosid ve diğer gangliosidlerin biriktiği tesbit edilmiştir ve bu birikimin hücresel patoloji üzerine etkisi araştırma projesinin konusunu oluşturmaktadır. Projemizde farelerde elde edilen farklı beyin bölgelerinde (serebral korteks, beyincik, hipokampus ve hipotalamus) ve fibroblast hücrelerinde apoptoz, otofaji, reaktif oksijen türleri yanı sıra ikincil lipid metabolizması araştırılmıştır. Elde edilecek sonuçlar ölümcül bir çocukluk çağı hastalığı olan ve ülkemizde sıklıkla rastlanan Tay-Sachs hastalığının hücresel patolojisinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacak ve yağ metabolizmasının düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen Neu3 sialidazı hedeflediği yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine öncelik edecektir.</p>
Anahtar Kelimeler:	Neu3, beta-HexA, Lizozom, Tay-Sachs,
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır